



# **Lésions de remodelage à la tomodynamométrie et leur impact clinique en hypertension artérielle pulmonaire**

**Mémoire**

**Virginie F. Tanguay**

**Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une vasculopathie progressive des vaisseaux pulmonaires. Elle est caractérisée par une augmentation anormale des résistances vasculaires pulmonaires causée par une oblitération et un remodelage des artères distales qui mènent ultimement à la défaillance cardiaque et au décès prématuré.

La tomodensitométrie thoracique est un examen d'imagerie non invasive utile pour l'investigation de ces patients. Elle a une valeur essentiellement diagnostique, permettant de préciser de quel type d'HTAP il s'agit, ainsi que les conditions pulmonaires associées. On y observe également certains changements de l'arbre vasculaire pulmonaire.

Récemment, le facteur de transcription *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) fut associé à une cascade de signalisation promouvant la transdifférenciation des cellules musculaires lisses en un phénotype similaire à l'ostéoblaste. Via l'augmentation de la rigidité artérielle, il fut avancé que cette voie moléculaire contribuerait à la pathogénèse de la maladie.

La calcification vasculaire résulte d'un processus de remodelage similaire avec l'expression de marqueurs ostéoblastiques et une biominéralisation artérielle. Celle-ci constitue un facteur de risque cardiovasculaire bien établi et potentiellement une cible thérapeutique en athérosclérose et en hypertension artérielle. Cette calcification est visible à la tomodensitométrie grâce à sa radiodensité élevée la distinguant de la paroi vasculaire saine.

Considérant le lien établi entre le phénotype ostéogénique et la calcification des artères, nous nous sommes intéressés au remodelage et à la biominéralisation artérielle pulmonaire à la tomodensitométrie thoracique et à sa valeur pronostique en HTAP. Nous avons documenté une augmentation de la radiodensité de la paroi des artères pulmonaires proximales à la tomodensitométrie. La radiodensité des artères démontra une bonne corrélation avec la calcification *in situ* chez une cohorte de 8 patients. Nous avons également documenté que cette radiodensité prédisait la survie chez les patients atteints d'HTAP. Ceci était indépendant des marqueurs traditionnels de sévérité clinique en HTAP, ainsi que de la réponse au traitement.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations, sigles & acronymes.....	xii
Remerciements.....	xvi
Avant-propos.....	xvii
Introduction .....	1
1. Circulation pulmonaire .....	1
2. Caractéristiques anatomiques.....	2
3. Caractéristiques hémodynamiques.....	5
3.1. Paramètres hémodynamiques.....	6
3.1.1. Résistance vasculaire pulmonaire.....	6
3.1.2. Compliance vasculaire pulmonaire.....	9
3.1.3. Relation compliance-résistance.....	10
3.1.4. Impédance vasculaire pulmonaire.....	11
3.2. Mécanismes de régulation passifs.....	17
3.3. Mécanismes de régulation actifs .....	20
Chapitre 1. L'hypertension pulmonaire (HTP).....	23
1.1 Définition .....	23
1.2 Classification .....	23
1.2.1 HTAP idiopathique .....	25
1.2.2 HTAP héréditaire.....	25
1.2.3 HTAP induite par des médicaments ou substances toxiques.....	26
1.2.4 HTAP associée à diverses pathologies.....	27
1.2.4.1 Connectivites.....	27

1.2.4.2	Infection au VIH.....	27
1.2.4.3	Hypertension portale .....	27
1.2.4.4	Cardiopathies congénitales.....	28
1.2.4.5	Schistosomiase .....	29
1.2.5	HTAP répondant aux bloqueurs des canaux calciques .....	29
1.2.6	HTAP avec atteinte capillaire et veineuse (MVOP/HCP).....	30
1.2.7	HTP persistante du nouveau-né .....	31
1.3	Présentation anatomopathologique de l'HTAP.....	32
1.3.1	Hypertrophie de l'adventice.....	32
1.3.2	Hypertrophie de la média .....	33
1.3.3	Formation d'une néo-intima .....	33
1.3.3.1	Lésion laminaire .....	34
1.3.3.2	Lésion non laminaire et thrombotique .....	34
1.3.4	Lésions complexes.....	35
1.3.4.1	Lésions de dilatation.....	35
1.3.4.2	Lésions plexiformes.....	36
1.3.4.3	Lésions d'artérite .....	36
1.4	Présentation clinique de l'HTAP .....	37
1.4.1	Diagnostic de L'HTAP .....	37
1.4.2	Suivi de l'HTAP .....	41
1.4.2.1	Test de marche .....	41
1.4.2.2	Classes fonctionnelles.....	41
1.4.2.3	Paramètres hémodynamiques .....	42
1.4.2.4	Biomarqueurs.....	42
1.5	Thérapies actuelles .....	42
1.5.1	Prise en charge non spécifique.....	42
1.5.2	Thérapies spécifiques .....	43

1.5.2.1	Inhibiteurs des canaux calciques .....	46
1.5.2.2	Antagonistes des récepteurs de l'endothéline.....	47
1.5.2.3	Inhibiteurs de la phosphodiesterase 5.....	47
1.5.2.4	Stimulateur de la guanylate cyclase.....	48
1.5.2.5	Analogues de la prostacycline.....	48
1.5.2.6	Combinaisons thérapeutiques.....	49
Chapitre 2.	Calcification vasculaire .....	51
2.1	Calcification ectopique vasculaire .....	51
2.1.1	Calcification intimale .....	51
2.1.2	Calcification médiale .....	52
2.2	Mécanismes moléculaires de la calcification vasculaire.....	52
2.2.1	Facteurs favorisant l'acquisition du phénotype procalcifiant.....	53
2.2.1.1	Inflammation.....	53
2.2.1.2	Stress oxydant.....	54
2.2.1.3	Stress du réticulum endoplasmique .....	54
2.2.1.4	Stress mécanique.....	55
2.2.1.5	Mécanismes de réparation de l'ADN.....	55
2.2.2	Perte des facteurs inhibant l'acquisition du phénotype procalcifiant.....	55
2.3	Méthode non invasive de quantification de la calcification chez l'humain .....	56
2.3.1	Radiodensité .....	56
2.3.2	Score d'Agatston.....	56
2.3.3	Score de volume calcique .....	57
2.3.4	Score de masse calcique .....	58
2.3.5	Interprétation et limitations .....	58
Chapitre 3.	Calcification vasculaire et HTAP.....	61
3.1	Identification de Runx2 comme acteur du remodelage et de la calcification vasculaire en HTAP ...	61
3.1.1	Problématique .....	61

3.1.2	Hypothèse.....	61
3.1.3	Résultats.....	62
3.1.3.1	Les artères de patients atteints d'HTAP présentent des calcifications.....	62
3.1.3.2	Runx2 est surexprimé chez les patients atteints d'HTAP consécutivement à la baisse de miR-204	64
3.1.3.3	Runx2 induit une activation de HIF-1 $\alpha$ .....	65
3.1.3.4	La voie Runx2/HIF-1 $\alpha$ favorise la calcification in vitro.....	66
3.1.3.5	La voie Runx2/HIF-1 $\alpha$ favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose .....	67
3.1.3.6	L'inhibition de Runx2 améliore l'HTP des rats Sugén/hypoxie.....	68
3.1.4	Discussion.....	71
3.2	Radiodensité des artères pulmonaires en hypertension artérielle pulmonaire : un signe de calcification précoce ? .....	72
3.2.1	Résumé.....	72
3.2.2	Problématique .....	73
3.2.3	Hypothèses .....	74
3.2.4	Objectifs .....	75
3.2.5	Matériel et méthodes.....	75
3.2.5.1	Participants.....	75
3.2.5.2	Tomodensitométrie multibarrette et analyse d'image .....	75
3.2.5.3	Collecte des données cliniques.....	77
3.2.5.4	Analyses statistiques.....	78
3.2.6	Résultats .....	78
3.2.6.1	Population à l'étude.....	78
3.2.6.2	Mesures tomodensitométriques et corrélations cliniques.....	80
3.2.6.3	Réponse initiale au traitement et suivi à long terme.....	82
3.2.7	Discussion.....	83
	Conclusion .....	88
	Bibliographie .....	90

Annexe A .....	110
Annexe B .....	124

# Liste des figures

Figure 1 : Schéma du système cardiovasculaire <sup>5</sup> .....	2
Figure 2 : Structure des sacs alvéolaires et leur vascularisation <sup>9</sup> .....	3
Figure 3 : Structure d'une artère et d'une artériole <sup>9</sup> .....	4
Figure 4 : Structure d'une veine et d'une veinule <sup>9</sup> .....	5
Figure 5 : Caractéristiques hémodynamiques des circulations pulmonaire et systémique <sup>13</sup> .....	6
Figure 6 : Effet de la respiration sur les résistances vasculaires pulmonaires <sup>3</sup> .....	9
Figure 7 : Décomposition d'un signal périodique en harmoniques par l'analyse de Fourier <sup>28</sup> .....	12
Figure 8 : Illustration d'une décomposition de Fourier <sup>26</sup> .....	13
Figure 9 : Détermination du module et de la phase de l'impédance par analyse de Fourier <sup>23</sup> .....	15
Figure 10 : Amplitude et phase de l'impédance mesurées chez un individu sain et un patient atteint d'HTP <sup>25,33</sup> . .....	16
Figure 11 : Effet de la gravité sur la circulation pulmonaire <sup>36</sup> .....	18
Figure 12 : Illustration des mécanismes de recrutement et distension du lit vasculaire pulmonaire <sup>3</sup> .....	19
Figure 13 : Dynamique de recrutement et distension des vaisseaux en fonction de la pression de perfusion sanguine <sup>37</sup> .....	20
Figure 14 : Lésions anatomopathologiques rencontrées en HTAP <sup>97</sup> .....	32
Figure 15 : Hypertrophie de la média et fibrose adventitielle <sup>104</sup> .....	33
Figure 16 : Lésion intimale laminaire concentrique <sup>104</sup> .....	34
Figure 17 : Lésions non laminaires et thrombotiques <sup>104</sup> .....	35
Figure 18 : Lésions de dilatation observées en l'HTAP <sup>104,112</sup> .....	35
Figure 19 : Lésions plexiformes <sup>104,112</sup> .....	36
Figure 20 : Lésion d'artérite <sup>117</sup> .....	37
Figure 21 : Courbes de pression obtenues au cathétérisme cardiaque droit <sup>124</sup> .....	39
Figure 22 : Algorithme diagnostique des HTPs <sup>119</sup> .....	40

Figure 23 : Algorithme diagnostique des HTPs <sup>119</sup> .....	40
Figure 24 : Voies de signalisation utilisées dans le traitement des patients atteints d'HTAP "non-répondeurs" <sup>138</sup> . .....	44
Figure 25 : Algorithme de traitement de l'HTAP <sup>139</sup> .....	46
Figure 26 : Principaux mécanismes moléculaires et médiateurs de la calcification vasculaire <sup>179</sup> . ....	53
Figure 27 : Calcul des différents scores permettant la quantification de la calcification vasculaire <sup>217</sup> . ....	57
Figure 28 : Illustration d'une des limites du score d'Agatston <sup>216</sup> . ....	59
Figure 29 : Les patients atteints d'HTAP présentent des calcifications vasculaires impliquant les cellules musculaires lisses. ....	63
Figure 30 : Expression de Runx2 et miR-204 au niveau des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires. .....	64
Figure 31 : La nucléarisation de HIF-1 $\alpha$ est modulée <i>in vitro</i> par Runx2. ....	66
Figure 32 : Influence de l'expression de Runx2 et HIF-1 $\alpha$ sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires. ....	67
Figure 33 : Effet de l'expression de Runx2 et HIF-1 $\alpha$ sur la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires. ....	68
Figure 34 : L'inhibition de Runx2 améliore <i>in vivo</i> l'hypertension pulmonaire dans le modèle Sugén/hypoxie. ....	69
Figure 35 : L'inhibition de Runx2 améliore <i>in vivo</i> le remodelage vasculaire et les calcifications dans le modèle Sugén/hypoxie. ....	70
Figure 36 : L'inhibition de Runx2 améliore <i>in vivo</i> le remodelage vasculaire. ....	71
Figure 37 : Schéma récapitulatif de la voie de signalisation miR-204/Runx2/HIF-1 $\alpha$ .....	72
Figure 38 : Exemple d'image de tomодensitométrie thoracique. ....	76
Figure 39 : Les analyses de reproductibilité confirment la concordance des mesures effectuées. ....	77
Figure 40 : Valeurs de radiodensité des artères pulmonaires et de l'aorte selon les groupes d'HTAP. ....	80
Figure 41 : Corrélation entre la radiodensité mesurée et le pourcentage de calcification observé <i>in situ</i> . ....	81

Figure 42 : Courbes compliance/résistance des patients atteints d'HTAP selon la radiodensité maximale moyenne mesurée. ....	82
Figure 43 : Courbes de survie des patients atteints d'HTAP en fonction de la radiodensité maximale moyenne mesurée. ....	83

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des HTP mise à jour lors du Congrès de Nice 2018.....	24
Tableau 2 : Classification fonctionnelle des patients souffrants d'HTP (WHO-FC). ....	41
Tableau 3 : Évaluation pronostique en HTAP <sup>128</sup> . ....	43
Tableau 4 : Classes de recommandation des traitements.....	45
Tableau 5 : Niveaux de preuve des recommandations.....	45
Tableau 6 : Recommandations des thérapies combinées initiales de l'HTAP <sup>128</sup> . ....	50
Tableau 7: Recommandations pour l'efficacité des combinaisons séquentielles <sup>128</sup> . ....	50
Tableau 8 : Caractéristiques des patients étudiés. ....	79

# Liste des abréviations, sigles & acronymes

<b>a<sub>0</sub></b> :	Coefficient de Fourier à la fréquence 0
<b>ADMA</b> :	<i>Asymmetric dimethylarginine</i>
<b>ADN</b> :	Acide désoxyribonucléique
<b>AKT</b> :	<i>Protein Kinase B</i>
<b>ALK-1</b> :	<i>Activin-like receptor kinase-1</i>
<b>a<sub>n</sub></b> :	Coefficient de Fourier à la fréquence d'harmonique n
<b>ARE</b> :	Antagonistes des récepteurs de l'endothéline
<b>ARN</b> :	Acide ribonucléique
<b>ATF4</b> :	Activating transcription factor 4
<b>ATP</b> :	Adenosine triphosphate
<b>BMP-2</b> :	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
<b>BMPR2</b> :	<i>Bone morphogenic protein receptor type 2</i>
<b>b<sub>n</sub></b> :	Coefficient de Fourier à la fréquence d'harmonique n
<b>BNP</b> :	<i>Brain natriuretic peptide</i>
<b>BSP</b> :	<i>Bone sialoprotein</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b> :	Ions calcium
<b>CAC</b> :	Calcium d'artère coronaire
<b>CaHA</b> :	Hydroxyapatite de calcium
<b>CAV1</b> :	Cavéoline-1
<b>CPET</b> :	Test d'exercice cardiopulmonaire ( <i>Cardiopulmonary exercise testing</i> )
<b>CTEPH</b> :	Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique ( <i>Chronic thromboembolic pulmonary hypertension</i> )
<b>DLCO</b> :	Capacité de diffusion du monoxyde de carbone ( <i>diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide</i> )
<b>Dyn</b> :	Dynes = 10 <sup>-5</sup> newton
<b>E</b> :	Module élastique d'un vaisseau
<b>EIF2AK4</b> :	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 4</i>
<b>ENG</b> :	Endogline
<b>FRC</b> :	Capacité résiduelle fonctionnelle ( <i>functional residual capacity</i> )
<b>Gdf2</b>	<i>Growth differentiation factor 2</i>
<b>GM-CSF</b> :	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
<b>H</b> :	Épaisseur d'un vaisseau
<b>HCP</b> :	Hémangiomatose capillaire
<b>HIF-1α</b> :	<i>Hypoxia-inducible factor 1 α</i>
<b>HRCT</b> :	<i>High Resolution Computerized Tomography scan</i>
<b>HTAP</b> :	Hypertension artérielle pulmonaire
<b>HTAPf</b> :	Hypertension artérielle pulmonaire familiale
<b>HTAPh</b> :	Hypertension artérielle pulmonaire héréditaire
<b>HTAPi</b> :	Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique
<b>HTAP-SSc</b> :	HTAP associée à sclérodémie systémique
<b>HTP</b> :	Hypertension pulmonaire
<b>Hz</b> :	Hertz
<b>IL</b> :	Interleukine

<b>iPDE-5 :</b>	Inhibiteurs de phosphodiesterase 5
<b>K<sup>+</sup> :</b>	Ions potassium
<b>KCNK3 :</b>	<i>Potassium channel subfamily K member 3</i>
<b>LA :</b>	Oreillette gauche ( <i>left atrium</i> )
<b>LV :</b>	Ventricule gauche ( <i>left ventricle</i> )
<b>MCP-1 :</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>M-CSF :</b>	<i>Colony stimulating factor M</i>
<b>MGP :</b>	<i>Matrix gla protein</i>
<b>MIF :</b>	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
<b>miR :</b>	MicroARN
<b>mmHg :</b>	Millimètre de mercure
<b>Msx2 :</b>	<i>Msh homeobox 2</i>
<b>MVOP :</b>	Maladie veino-occlusive pulmonaire
<b>NF-κB :</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>NO :</b>	Oxyde nitrique
<b>OGP :</b>	Ostéoprotégérine
<b>Osx :</b>	Osterix
<b>P :</b>	Pression
<b>Pa :</b>	Pression artérielle
<b>PA :</b>	Pression alvéolaire
<b>PACO<sub>2</sub> :</b>	Pression partielle en dioxyde de carbone
<b>PAH :</b>	HTAP ( <i>pulmonary arterial hypertension</i> )
<b>PAO<sub>2</sub> :</b>	Pression partielle en dioxygène alvéolaire
<b>PAP :</b>	Pression dans l'artère pulmonaire
<b>PAPm :</b>	Pression dans l'artère pulmonaire moyenne
<b>PAPO :</b>	Pression artérielle pulmonaire d'occlusion
<b>PARP1 :</b>	poly(ADP-ribose) polymérase
<b>PI3K :</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>POGm :</b>	Pression dans l'oreillette gauche moyenne
<b>PSVD :</b>	Pression systolique ventriculaire droite
<b>Pv :</b>	Pression veineuse
<b>PVOD :</b>	Maladie veino-occlusive pulmonaire ( <i>pulmonary veino-occlusive disease</i> )
<b>Q :</b>	Débit
<b>r :</b>	Rayon de la lumière vasculaire
<b>RA :</b>	Oreillette droite ( <i>right atrium</i> )
<b>RAGE :</b>	<i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
<b>RANK :</b>	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
<b>RANKL :</b>	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
<b>ROS :</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>Runx2 :</b>	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
<b>RV :</b>	Volume résiduel ( <i>residual volume</i> )
<b>RV :</b>	Ventricule droit ( <i>right ventricle</i> )
<b>RVP :</b>	Résistance vasculaire pulmonaire
<b>Smad9 :</b>	<i>Mothers against decapentaplegic 9</i>

<b>Sox9 :</b>	<i>Sex determining region Y-box 9</i>
<b>STAT3 :</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>SVO<sub>2</sub></b>	<i>Saturation veineuse en O<sub>2</sub></i>
<b>T :</b>	<i>Période d'une onde</i>
<b>TAPSE :</b>	<i>Tricuspid annular plane systolic excursion</i>
<b>TBX4 :</b>	<i>T-box 4</i>
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	<i>Tumor growth factor-<math>\beta</math></i>
<b>TLC :</b>	<i>Capacité pulmonaire totale (total lung capacity)</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>UH :</b>	<i>Unités de Hounsfield</i>
<b>UPR :</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>VE/VCO<sub>2</sub> :</b>	<i>Pente ventilation minute/volume de dioxyde de carbone expiré</i>
<b>VIH :</b>	<i>Virus d'immunodéficience humaine</i>
<b>WHO-FC :</b>	<i>World Health Organization Functionnal Class</i>
<b>WU :</b>	<i>Unité de Wood</i>
<b>XBP1 :</b>	<i>X-box binding protein 1</i>
<b>Z :</b>	<i>Impédance</i>
<b>Z<sub>0</sub> :</b>	<i>Impédance à l'harmonique 0 Hz</i>
<b>Z<sub>c</sub> :</b>	<i>Impédance caractéristique</i>
<b><math>\Delta P</math> :</b>	<i>Variation de pression</i>
<b><math>\Delta V</math> :</b>	<i>Variation de volume</i>
<b><math>\eta</math> :</b>	<i>Viscosité</i>
<b><math>\theta</math> :</b>	<i>Déphasage (en radian)</i>
<b><math>\theta_P</math> :</b>	<i>Phase de l'onde de pression</i>
<b><math>\theta_Q</math> :</b>	<i>Phase de l'onde de débit</i>

*“Let your curiosity take you somewhere. And  
then when you’re there, let the curiosity  
inform you and learn, learn, learn”*

# Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Docteur Steeve Provencher. Merci pour votre confiance en moi, votre appui et votre disponibilité. Bien évidemment, ces quelques mots ne seront pas suffisants pour vous exprimer toute ma gratitude envers le mentor que vous avez été .

Je remercie également Dr Bonnet et tout le groupe de recherche en hypertension pulmonaire pour leur précieuse aide dans ce qui fut pour moi un premier contact avec la recherche fondamentale. Je remercie particulièrement Grégoire pour ses enseignements et pour m'avoir intégrée à son projet et me laisser le poursuivre par le volet clinique.

Merci aux patients, sans qui la recherche ne serait pas possible. Merci de nous faire confiance, autant comme cliniciens que comme chercheurs.

Finalement, merci infiniment à ma famille, mon conjoint et mes amis pour leur soutien et leur amour. Je ne pourrais être mieux entourée.

Ce mémoire appartient donc à vous tous, je n'aurais pas pu le faire sans vous.

## Avant-propos

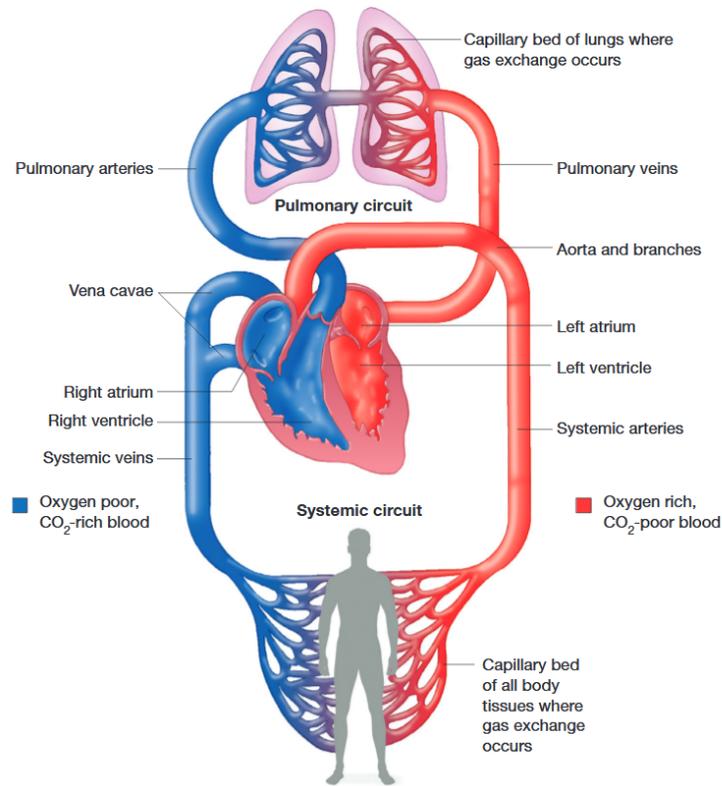
Ce mémoire présente une introduction à propos de l'HTAP et de ses caractéristiques hémodynamiques. Il détaille ensuite l'état actuel de la littérature scientifique à propos de la calcification vasculaire en HTAP. Il explique les résultats des travaux de mon collègue Grégoire Ruffenach, présentés dans sa thèse, auxquels j'ai participé, et qui ont permis d'identifier une nouvelle voie de signalisation impliquée dans la physiopathologie de l'HTAP. J'y présente ensuite mon projet de maîtrise qui représente la suite et le volet clinique du projet de mon collègue. Cet article fut écrit pour être intégré dans ce mémoire et ne sera pas soumis dans un journal puisqu'une partie des résultats présentés font déjà l'objet d'une publication en 2018 dans *l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, dont je suis l'auteure principale. Les coauteurs de cette publication sont Camille Babin, Gabrielle Giardetti, Catherine Sohier-Poirier, Vincent Ménard-Cholette, Benoît Ranchoux, Grégoire Ruffenach, Sébastien Bonnet et Steeve Provencher. Mes rôles dans la réalisation de ce projet furent ceux en lien avec le développement du projet, la collecte des données pour laquelle je fus aidée de mes collègues, l'analyse des données, la rédaction de l'article et sa soumission.

# Introduction

## 1. Circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire est le système qui permet le transport du sang désoxygéné et riche en dioxyde de carbone à travers les poumons où le dioxyde de carbone est éliminé et où le sang est réoxygéné. Cette circulation se fait du cœur droit, au travers des poumons, vers les cavités cardiaques gauches avant d'atteindre finalement la circulation systémique. Le dioxygène ainsi introduit dans la circulation sanguine générale est indispensable à la respiration cellulaire et la production d'ATP. La respiration cellulaire produit en retour du dioxyde de carbone voyageant dans le plasma sous forme dissoute et combinée, qui sera relargué lors du passage dans les poumons. Ces échanges gazeux se font grâce à un réseau complexe de vaisseaux sanguins; la circulation pulmonaire<sup>1,2</sup>.

La circulation pulmonaire est entièrement dédiée aux échanges gazeux et est indépendante de la circulation bronchique qui, elle, fait partie de la circulation systémique (Figure 1). La circulation pulmonaire reçoit le sang appauvri en dioxygène, et riche en dioxyde de carbone, de l'artère pulmonaire et redonne du sang riche en dioxygène *via* les veines pulmonaires. La circulation bronchique apporte, *via* les artères bronchiques, du sang riche en dioxygène issu directement de l'aorte et/ou des artères intercostales. Ce sang permet l'approvisionnement du poumon en sang oxygéné et en nutriments nécessaires à son propre métabolisme. Celui-ci permet également la perfusion des ganglions lymphatiques hilaires, de la plèvre et de l'œsophage. La circulation bronchique se termine dans les veines bronchiques pour rejoindre la circulation veineuse générale<sup>3</sup>. Cependant, la majeure partie du sang issu des artères bronchiques est, une fois désoxygéné, drainé dans la circulation pulmonaire par anastomose broncho-pulmonaire où il se retrouve dilué dans le sang oxygéné des veines pulmonaires. Il a été estimé ainsi que seul 13% du sang apporté par ces artères bronchiques se retrouve au niveau des veines bronchiques<sup>4</sup>.

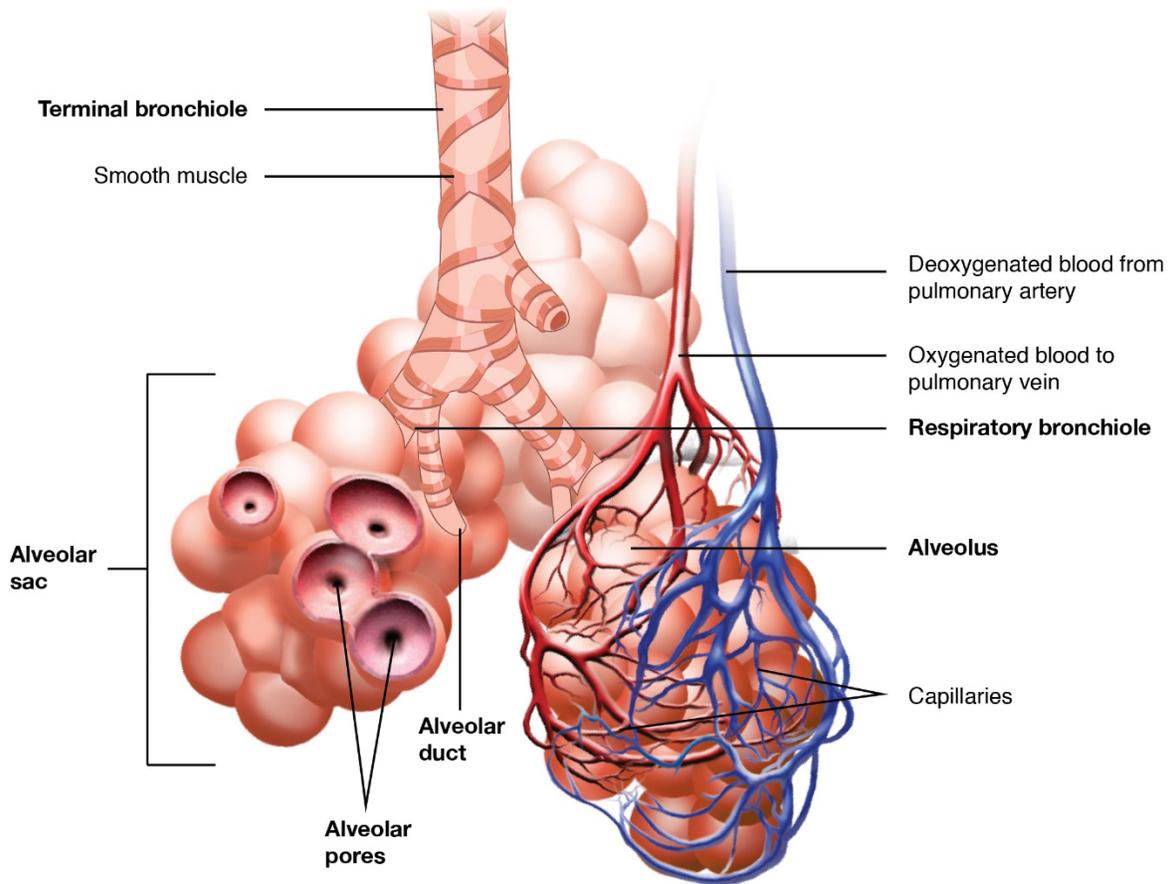


**Figure 1 : Schéma du système cardiovasculaire<sup>5</sup>.**

*Le système cardiovasculaire comprenant, en série, la circulation pulmonaire et la circulation systémique. La circulation pulmonaire sert à l'oxygénation et à l'élimination du gaz carbonique. La circulation systémique permet d'amener le sang riche en dioxygène aux organes et de libérer les tissus du gaz carbonique produit.*

## **2. Caractéristiques anatomiques**

Le sang désoxygéné est apporté au cœur par les veines caves supérieure et inférieure qui se déversent dans l'oreillette droite. Celle-ci l'éjecte à travers la valve tricuspide dans le ventricule droit qui l'envoie à basse pression (pression artérielle pulmonaire moyenne [PAPm] entre 11-17 mmHg) dans l'artère pulmonaire via la valve pulmonaire. L'artère pulmonaire se divise en deux troncs dont le diamètre est égal à la moitié de celui de l'artère pulmonaire à la sortie du ventricule droit (3 cm environ pour l'artère pulmonaire principale et 1,5 cm après la première bifurcation). Chaque sous-segment se divise en artères de plus petit calibre pour apporter le sang à chaque lobe pulmonaire (au nombre de 3 du côté droit et 2 à gauche). Celles-ci se divisent rapidement de façon successive à nouveau au sein de chaque lobe, en artères segmentaires, sous-segmentaires, et ainsi de suite, pour former l'arbre artériel pulmonaire. Ces nombreuses sous-divisions permettent au sang d'atteindre les artérioles et enfin les quelques 280 milliards de capillaires pulmonaires d'environ 6 µm de diamètre. Ceux-ci sont en contact avec environ 300 millions de sacs alvéolaires contenant l'air inspiré (Figure 2). Cela représente une surface d'échange alvéolaire de 50 à 100 m<sup>2</sup> <sup>1,3,6-8</sup>.



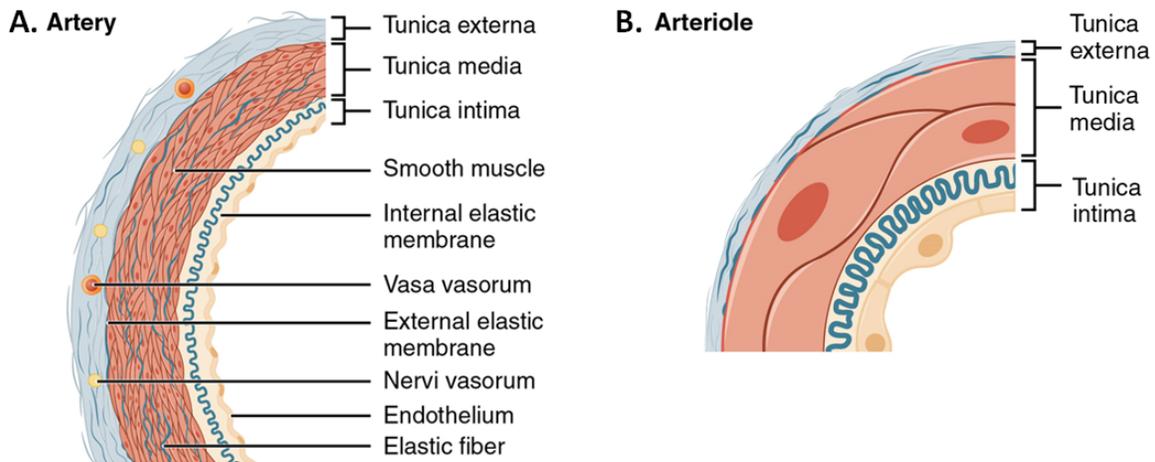
**Figure 2 : Structure des sacs alvéolaires et leur vascularisation<sup>9</sup>.**

*Les bronches, puis les bronchioles aboutissent aux alvéoles pulmonaires regroupés en sacs alvéolaires. Les artérioles apportant le sang pauvre en dioxygène se subdivisent en capillaires qui entourent chaque alvéole. Ces capillaires sont le lieu des échanges gazeux. Ils se regroupent ensuite en veinules pour exporter le sang riche en dioxygène vers les veines pulmonaires.*

Sur le 1L de sang que peut contenir la circulation pulmonaire, correspondant environ au cinquième du volume de sang total, environ 100mL se trouvent dans les capillaires, lieu des échanges gazeux<sup>10</sup>. Une fois réoxygéné, le sang rejoint les veinules pulmonaires, puis les veines pulmonaires sous-segmentaires, segmentaires, lobaires et enfin les veines pulmonaires. Celles-ci se déversent dans l'oreillette gauche qui éjecte le sang au travers la valve mitrale dans le ventricule gauche. Ce dernier l'expulse alors à très forte pression à travers la valve aortique dans l'aorte grâce à de puissantes contractions, où il retourne dans la circulation systémique. Il faut seulement 4 à 5 secondes à une hématie pour traverser la circulation pulmonaire<sup>1-3,8</sup>.

Les artères et les veines pulmonaires ont des compositions similaires à celles présentes dans la circulation systémique. Cependant, les faibles pressions sanguines au niveau de la circulation pulmonaire font que le lit artériel ne nécessite pas de musculation similaire à celle observée dans la circulation systémique. Ainsi la

paroi de l'artère pulmonaire principale ne fait que 30% de l'épaisseur de l'aorte et les petites artérioles pulmonaires ne sont souvent constituées que d'une monocouche de cellules endothéliales avec très peu de cellules musculaires<sup>10</sup>. Les artères pulmonaires de diamètre extérieur supérieur à 2 mm sont formées d'une intima de cellules endothéliales (*tunica intima*), d'une média de fibres élastiques et cellules musculaires lisses (*tunica media*), ainsi que d'une adventice constituée d'une couche élastique longitudinale, de cellules interstitielles telles que des fibroblastes, de cellules nerveuses et de *vasa vasora* issues de la circulation bronchique (*tunica externa*) (Figure 3A). Ensuite, plus le réseau se ramifie, plus la composition exacte de la média des artères dépend de leur diamètre. Les artères pulmonaires de plus de 2 mm de diamètre possèdent au moins 4 couches élastiques bien distinctes. Entre 2 mm et 150 µm de diamètre, le nombre de couches va diminuer progressivement à mesure que leur délimitation se fait de moins en moins nette, et que la proportion de cellules musculaires lisses augmente. À 1 mm de diamètre, seules 2 couches élastiques (une externe et une interne) sont encore visibles. En dessous de 1 mm, les couches élastiques ont tendance à être plus fragmentées, voir à disparaître totalement par endroit (Figure 3B). La muscularisation des plus petites artères et artérioles devient non uniforme. Si des vaisseaux artériels possédant une couche musculaire lisse sont encore visibles entre 35 et 228 µm, des artérioles non muscularisées apparaissent en dessous d'environ 120 µm de diamètre. Ces artérioles non muscularisées deviennent les capillaires pulmonaires. À ce niveau, le vaisseau n'est plus qu'une monocouche de cellules endothéliales extrêmement fines ne mesurant que 20-30 nm d'épaisseur au niveau de l'alvéole pulmonaire. On estime qu'un adulte possède plus de 125 m<sup>2</sup> de capillaires pulmonaire<sup>7,11</sup>.

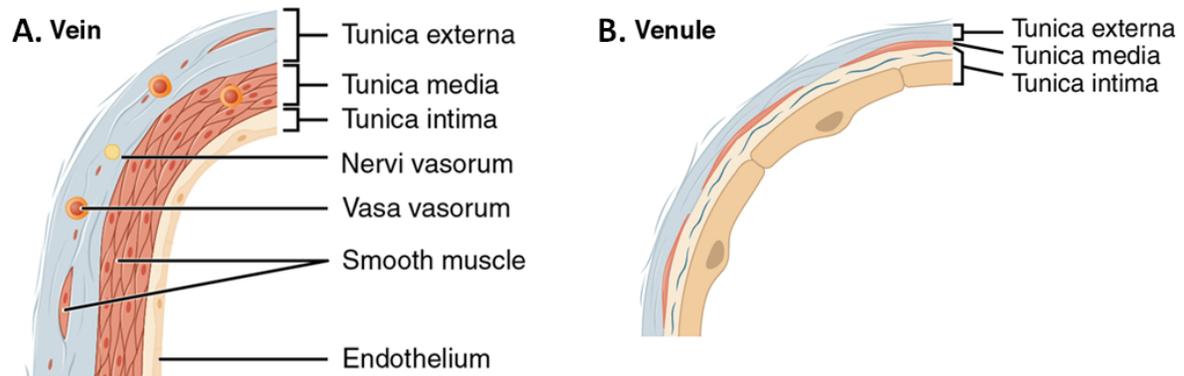


**Figure 3 : Structure d'une artère et d'une artériole<sup>9</sup>.**

*Adapté de "Douglas College Human Anatomy & Physiology I", Douglas College.*

Les veinules et les petites veines ont une structure similaire aux artérioles et petites artères pulmonaires (Figure 4). Les petites veines diffèrent cependant des artères par la forme polygonale et ronde des noyaux des cellules endothéliales qui seront ovales ou elliptique du côté artériel. Enfin, les veines de plus gros calibre auront une

paroi plus fine que les artères de même calibre avec, proportionnellement, une média plus musculaire qu'élastique. Ces couches élastiques sont moins distinctes, et parfois même absentes<sup>11</sup>.



**Figure 4 : Structure d'une veine et d'une veinule<sup>9</sup>.**

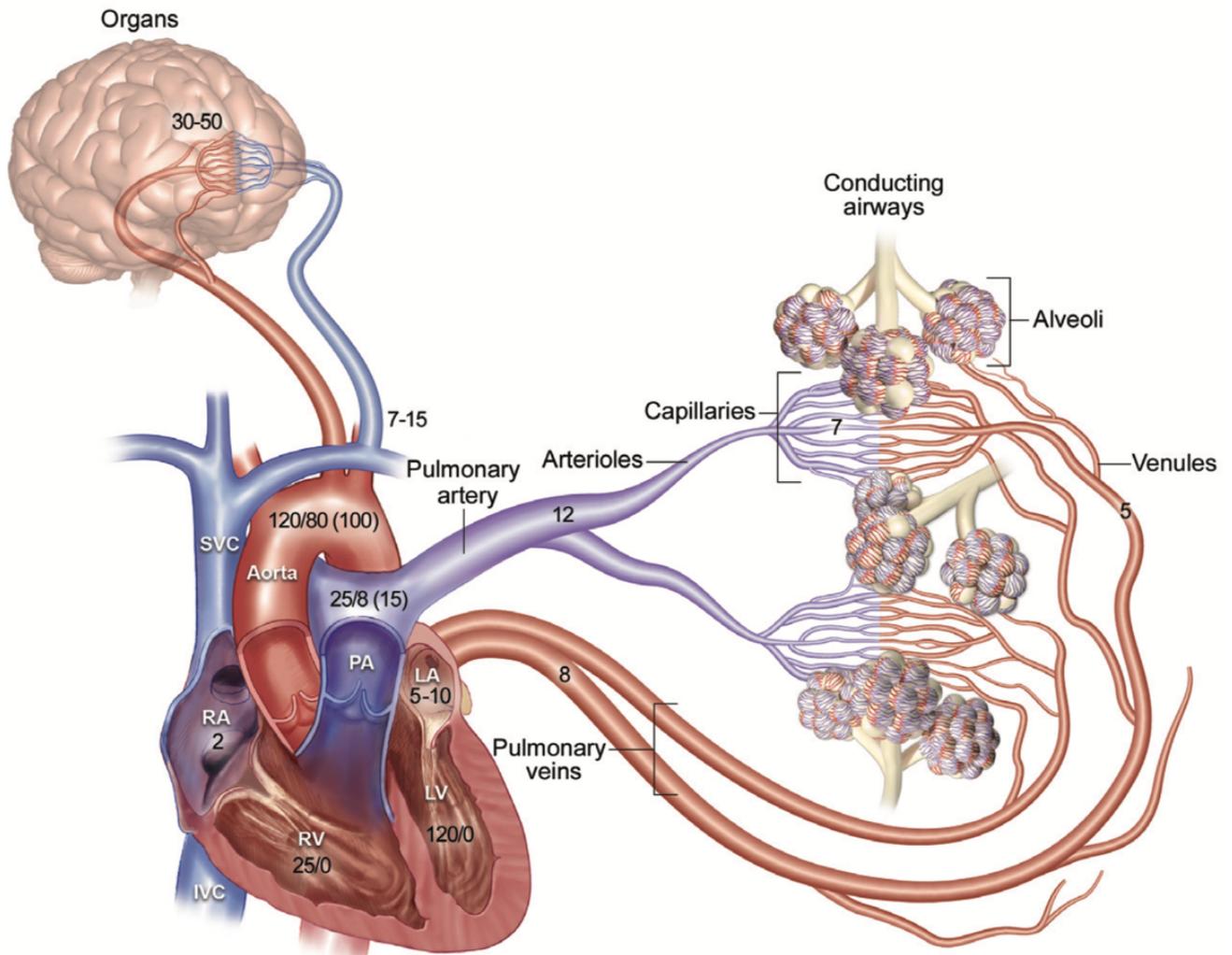
*Adapté de "Douglas College Human Anatomy & Physiology I", Douglas College.*

La faible épaisseur, voire l'absence, de couche musculaire au niveau des artérioles pulmonaires permet à celle-ci d'être plus élastiques et de réduire grandement les résistances vasculaires par rapport aux artérioles systémiques. Cela offre à la circulation pulmonaire une grande résilience face aux changements de flux sanguin. En effet, le débit sanguin à la sortie du ventricule droit est identique au débit sortant du ventricule gauche (si l'on néglige le passage du sang de la circulation bronchique vers la circulation pulmonaire par anastomose broncho-pulmonaire citée précédemment, ainsi qu'en négligeant le flux provenant des artères coronaires *via* les veines de Thébésius) et peut grandement varier selon l'activité physique. Ainsi, s'il faut 0,75 seconde à une hématie pour passer les capillaires pulmonaires au repos, cela est réduit à seulement 0,3 seconde durant l'effort<sup>3,10</sup>.

### 3. Caractéristiques hémodynamiques

La circulation pulmonaire est une circulation à haut débit, tout comme la circulation systémique. Les 2 systèmes étant en série, le débit cardiaque (droit et gauche) correspond à environ  $3,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^2$  de surface corporelle au repos<sup>3</sup>. Cela représente environ  $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  pour un individu moyen de 70kg<sup>12</sup>. Cependant, contrairement à la circulation systémique, la circulation pulmonaire est à basse pression. La pression systolique ventriculaire droite (PSVD) est aux alentours de 25 mmHg et la PAPm à 15 mmHg. Au niveau des artérioles précapillaires, elle est estimée à 12 mmHg, et à 8 mmHg dans les veines pulmonaires. Dans le cas de la circulation systémique, la pression systolique ventriculaire gauche est environ à 120 mmHg avec une pression artérielle aortique moyenne de 100 mmHg. Au niveau précapillaire systémique, celle-ci est estimée à 30 mmHg au niveau des artérioles, et en postcapillaire, à 15 mmHg au niveau des veinules. La circulation pulmonaire possède donc un gradient de pression relativement faible comparé à celui de la circulation générale (Figure 5). La pression au sein des capillaires pulmonaires est aux alentours de 10 mmHg. La pression oncotique étant de 25 mmHg, cela suffit à

maintenir un gradient de pression de 15 mmHg dirigé vers l'intérieur du capillaire. Cela évite ainsi l'extravasation de liquide dans les alvéoles pulmonaires et prévient la formation d'œdèmes<sup>3,10</sup>.



**Figure 5 : Caractéristiques hémodynamiques des circulations pulmonaire et systémique<sup>13</sup>.**

*Pressions vasculaires exprimées en mmHg. X/X : pressions systolique/diastolique; (X) pression moyenne; SVC : veine cave supérieure; IVC : veine cave inférieure; RA : oreillette droite; RV : ventricule droit; PA : artère pulmonaire; LA : oreillette gauche; LV : ventricule gauche.*

### 3.1. Paramètres hémodynamiques

#### 3.1.1. Résistance vasculaire pulmonaire

La résistance vasculaire représente le gradient de pression nécessaire pour faire circuler 1 unité de débit sanguin au travers des vaisseaux<sup>14</sup>. Elle permet ainsi d'apprécier les forces s'opposant à l'écoulement sanguin dans ces derniers. Elle peut être exprimée en mmHg.min.L<sup>-1</sup>, ou en unité de Wood (*Wood Unit* – WU; 1 WU= 1

mmHg.min.L<sup>-1</sup>), ou encore en dynes.sec.cm<sup>-5</sup> (1 WU= 80 dynes.sec.cm<sup>-5</sup>)<sup>15</sup>. Elle est calculée selon une formule dérivée de la loi d'Ohm, par la variation de pression ( $\Delta P$ ) au sein d'un vaisseau, divisé par le flux sanguin qui y circule:

$$\text{Résistance vasculaire (mmHg. min. L}^{-1} \text{ ou WU)} = \frac{\Delta P \text{ (mmHg)}}{\text{Flux sanguin (L. min}^{-1}\text{)}}$$

Le flux sanguin représente ici le volume de sang passant dans le lit vasculaire pulmonaire dans un temps donné. Aux fins de ces calculs, il est considéré comme continu, bien que pulsatile en réalité. Il est donné par l'équation suivante :

$$\text{Flux sanguin (L. min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Volume sanguin pulmonaire (L)}}{\text{Temps (min)}}$$

La résistance vasculaire pulmonaire (RVP) peut ainsi être estimée par différence entre la PAPm et la pression dans l'oreillette gauche moyenne (POGm) divisée par le flux sanguin pulmonaire par l'équation suivante<sup>16,17</sup> :

$$\text{RVP (mmHg. min. L}^{-1} \text{ ou WU)} = \frac{\text{PAPm (mmHg)} - \text{POGm (mmHg)}}{\text{Flux sanguin (L. min}^{-1}\text{)}}$$

En négligeant l'apport des veines de Thébésius et l'anastomose broncho-pulmonaire, le flux sanguin pulmonaire peut être estimé par le débit cardiaque, plus facilement mesurable. De plus, il est possible d'estimer la POGm par la mesure de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) qui peut être prise lors du cathétérisme cardiaque droit, en gonflant un ballonnet afin de créer une obstruction dans une petite artère. La pression résiduelle en aval du ballonnet reflète alors la pression au sein des veinules pulmonaires. On peut ainsi avoir une estimation de la RVP avec l'équation suivante :

$$\text{RVP (mmHg. min. L}^{-1} \text{ ou WU)} = \frac{\text{PAPm (mmHg)} - \text{PAPO (mmHg)}}{\text{Débit cardiaque (L. min}^{-1}\text{)}}$$

Pour faciliter plusieurs calculs, on considère que le sang en circulation se comporte presque comme un fluide newtonien. Cela signifie que sa viscosité ( $\eta$ ) est constante, quelles que soient les contraintes qui lui sont appliquées (comme la pression ou les contraintes de cisaillements). En considérant le lit vasculaire pulmonaire comme un tube droit de forme circulaire et l'écoulement du sang comme laminaire, on peut utiliser la loi de Poiseuille-Hagen pour estimer les résistances vasculaires :

$$\text{RVP (WU)} = \frac{8 \cdot \eta \cdot \text{Longueur du vaisseau}}{\pi \cdot (\text{rayon de la lumière du vaisseau})^4}$$

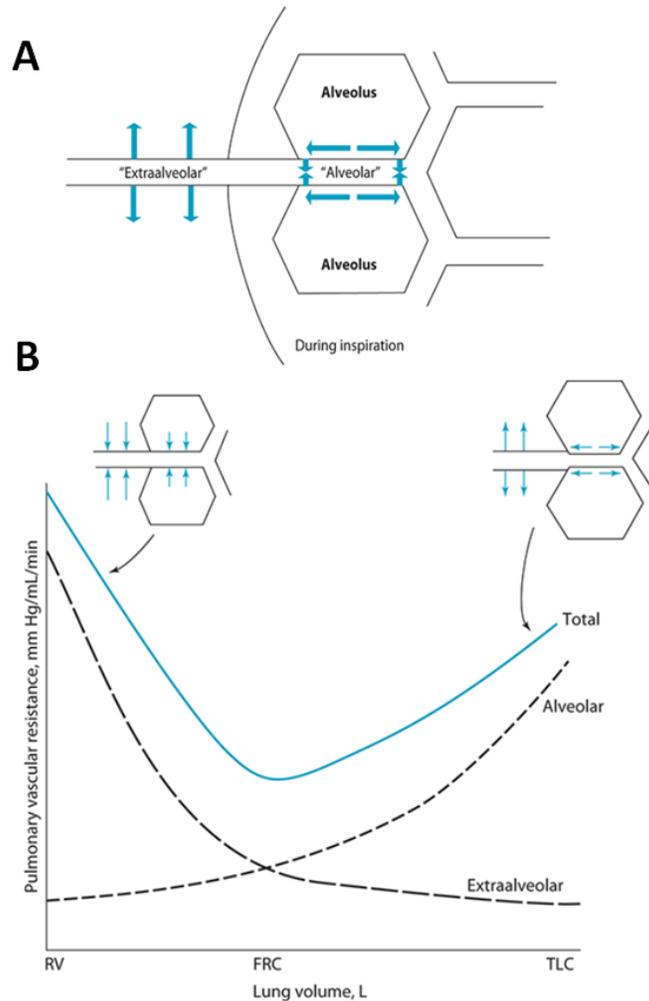
En combinant les deux équations on obtient donc la formule suivante :

$$RVP (WU) = \frac{8 \cdot \eta \cdot \text{Longueur}}{\pi \cdot \text{rayon}^4} = \frac{PAPm - PAPO}{\text{Débit cardiaque}}$$

On peut ainsi voir que la RVP dépend grandement de la taille de la lumière vasculaire. Ainsi, une diminution de l'ordre de 10% dans le rayon de celle-ci suffit à faire augmenter la RVP presque 50%. L'état de vasodilatation ou de vasoconstriction sont donc des acteurs majeurs dans la régulation de la RVP et de la PAPm. L'augmentation pathologique de la RVP et de la PAPm peut ainsi être le reflet direct de la diminution de la lumière des vaisseaux, tel qu'observé en cas de remodelage vasculaire aberrant dans l'hypertension pulmonaire (HTP)<sup>17</sup>.

Comme pour la PAPm, la RVP est très faible dans le poumon comparativement à la circulation systémique : c'est une circulation basse pression/basse résistance. La pression artérielle moyenne et résistance vasculaire sont respectivement d'environ 15 mmHg et 1 WU dans la circulation pulmonaire contre 85 mmHg et 12,5 WU dans la circulation systémique. Une résistance de 1 WU signifie qu'il suffit d'un gradient de 1 mmHg pour faire circuler 1 L.min<sup>-1</sup> de sang dans le poumon. Avec un débit pulmonaire moyenne de 5 L.min<sup>-1</sup>, cela ne représente que 5 mmHg de gradient moteur<sup>14</sup>.

La RVP n'est cependant pas répartie de façon uniforme au sein du lit vasculaire pulmonaire. La faible pression sanguine et la faible résistance mécanique due à leur fine muscularisation rendent les artérioles sensibles aux variations de pressions intra-alvéolaires et intrapleurales. Ainsi, durant l'inspiration, les capillaires pulmonaires en contact avec les alvéoles vont être étirés à mesure que ces dernières se distendent. Cela provoque un allongement des capillaires et un rétrécissement de leur diamètre, et augmente alors la RVP localement. L'augmentation du volume du système pulmonaire va également diminuer la pression intrapleurale. Les artérioles et veinules n'étant pas comprimées par les sacs alvéolaires vont ainsi voir leur pression transmurale (différence entre la pression interne du vaisseau et la pression extérieure) augmenter, ce qui provoque une augmentation de leur diamètre et diminue la RVP à leur niveau (Figure 6A). À l'inverse, lors de l'expiration, le volume alvéolaire diminue, ce qui réduit la RVP au niveau des capillaires alvéolaires. Parallèlement, les artérioles et veinules reprennent leur diamètre normal à mesure que la pression intrapleurale diminue. Dans le cas particulier d'une expiration forcée, la pression intrapleurale devient positive ce qui comprime les vaisseaux extra-alvéolaires et augmente leur RVP. À l'inverse, cela diminue grandement la taille des alvéoles et réduit leur compression sur les capillaires péri-alvéolaires et diminue donc localement leur RVP. Les sections de vaisseaux réagissent donc différemment lors des phases du cycle inspiration/expiration en fonction de leur localisation péri-ou extra-alvéolaire. Ces sections étant branchées en série, la RVP totale du réseau dépend des résistances vasculaires de l'ensemble des vaisseaux (Figure 6B)<sup>3</sup>.



**Figure 6 : Effet de la respiration sur les résistances vasculaires pulmonaires<sup>3</sup>.**

*A : schéma de forces appliquées sur les parties extra- et périalvéolaires du capillaire. B : courbes des RVP au niveau extra- et périalvéolaire en fonction du volume pulmonaire ainsi que de la RVP moyenne dans l'ensemble du lit capillaire. RV : volume résiduel (residual volume), qui correspond au volume d'air restant dans les poumons après une expiration forcée; FRC : capacité résiduelle fonctionnelle (functional residual capacity), qui représente le volume d'air restant dans le poumon à la fin d'une expiration normale; TLC : capacité pulmonaire totale (total lung capacity), qui représente le volume d'air contenu dans les poumons lorsque l'on prend une inspiration maximale.*

### 3.1.2. Compliance vasculaire pulmonaire

Durant la systole, une partie du volume sanguin éjecté est en quelque sorte emmagasiné dans les artères pulmonaires compliantes qui se distendent. Durant la diastole, ce volume de sang reprend sa circulation grâce au retour élastique du vaisseau. C'est l'effet "Windkessel". L'importante compliance totale du lit vasculaire pulmonaire reflète sa capacité à emmagasiner le sang à chaque contraction du ventricule droit, et donc son potentiel élastique. Encore une fois, elle est dépendante de tout le lit vasculaire pulmonaire, contrairement à la circulation systémique, où la compliance est tributaire surtout des grandes artères élastiques. Elle correspond

à la variation de volume sanguin ( $\Delta V$ ) dans tout le lit artériel, divisée par la variation de pression transmurale ( $\Delta P$ ) :

$$\text{Compliance (L. mmHg}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta V \text{ sang artériel (L)}}{\Delta P \text{ transmurale (mmHg)}}$$

La mesure de la pression transmurale est difficilement obtenable *in vivo*, et celle du volume sanguin artériel est impossible à obtenir, car une partie du volume éjecté par le ventricule droit passe directement dans le système veineux. Cependant, il est possible d'estimer ces paramètres par pression artérielle pulmonaire pulsée (différence entre la PAP systolique et diastolique) et le volume d'éjection systolique du ventricule droit pour obtenir la capacitance artérielle pulmonaire :

$$\text{Capacitance (L. mmHg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{volume d'éjection systolique (L)}}{\text{Pression artérielle pulmonaire pulsée (mmHg)}}$$

La capacitance artérielle pulmonaire est de l'ordre de 6 mL.mmHg<sup>-1</sup>, soit 4 fois plus élevée que celle de la circulation systémique, qui est de 1,5 mL.mmHg<sup>-1</sup>. Cependant, la capacitance reste une estimation grossière de la compliance et aura tendance à la surestimer (de l'ordre de 81% chez le porc et 60% chez le chien)<sup>14,18</sup>.

### 3.1.3. Relation compliance-résistance

La RVP et la compliance permettent d'appréhender le bon fonctionnement du lit vasculaire pulmonaire. En condition physiologique, ces deux paramètres sont inversement proportionnels, une augmentation de la RVP étant accompagnée d'une baisse de compliance vasculaire pulmonaire, et *vice versa*<sup>18,19</sup>. Ainsi, leur produit reste constant. Ceci peut se comprendre de deux façons. La première consiste à considérer que la PAPm détermine la compliance artérielle. En conséquence, l'augmentation de la RVP induit une élévation dans la pression vasculaire qui a son tour augmente le diamètre des vaisseaux et diminue la compliance dans la relation pression-diamètre qui est non-linéaire. La seconde explication est que, les artères proximales ne représentant que 15 à 20% de la compliance artérielle pulmonaire totale, la majeure partie de celle-ci est déterminée par la compliance des petites artérioles distales de diamètre inférieur à 8  $\mu\text{m}$ . Donc, une oblitération des artérioles pulmonaires provoquerait une baisse de la compliance totale, et donc une augmentation de la RVP, et conséquemment de la PAPm. En comparaison avec la circulation pulmonaire, la circulation systémique présente environ 10 fois moins d'artérioles, une résistance vasculaire 10 fois supérieure, et une compliance 10 fois moindre. En outre, la compliance vasculaire systémique totale est principalement déterminée par la compliance de l'aorte, alors que la résistance vasculaire systémique est majoritairement localisée dans les petites artères et les artérioles. Dans le cas de l'hypertension artérielle systémique associée à l'épaississement et la calcification des grandes artères chez les sujets âgés par exemple, cela explique pourquoi la compliance

artérielle totale est diminuée, sans que cela affecte la résistance vasculaire. Par contre, dans la circulation pulmonaire, l'augmentation de la RVP, et donc de la PAPm, est due à la perte de petites artères et artéioles qui diminue la compliance totale du lit vasculaire pulmonaire<sup>20</sup>. Le calcul de la RVP et de la compliance permet de définir une unité de temps appelé RC-time:

$$\text{RC time (min)} = \text{RVP (mmHg. min. L}^{-1}\text{)} \times \text{Compliance (L. mmHg}^{-1}\text{)}$$

Le RC-time permet d'appréhender la baisse de la PAP en diastole et de quantifier la postcharge du ventricule droit, qui correspond aux forces s'opposant à l'éjection du sang lors de la systole. Chez les sujets sains, le RC-time est compris entre 0,16-0,39 seconde contre 0,21-0,83 seconde chez les patients souffrant d'HTP<sup>18,19</sup>.

### 3.1.4. Impédance vasculaire pulmonaire

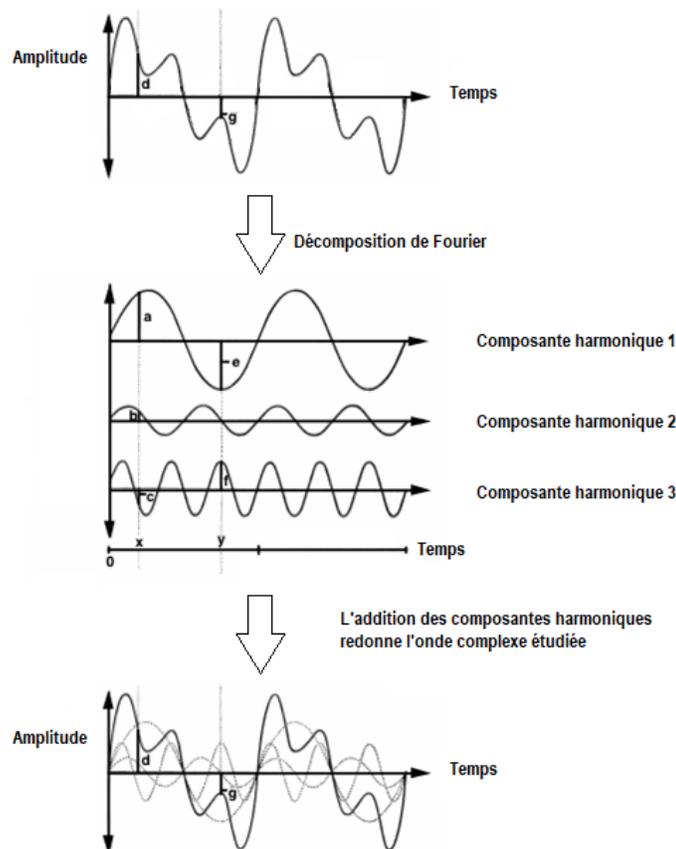
Les calculs décrits précédemment permettent des estimations des paramètres hémodynamiques moyens sur un cycle systole/diastole complet. Or, la circulation pulmonaire est en réalité pulsatile : le sang est éjecté du ventricule droit par à-coups, ce qui provoque des cycles de dilatation/relaxation du lit vasculaire. Le postulat que le flux vasculaire pulmonaire est continu et uniforme permet d'obtenir facilement des paramètres pertinents pour évaluer l'état moyen de ce dernier. Cependant, cette simplification ne tient pas compte des forces qu'exerce le lit vasculaire pulmonaire à l'encontre du flux sanguin pulsé et donc du ventricule droit. En effet, l'augmentation importante du flux induite par la systole crée une déformation qui se propage tout le long des vaisseaux dans le sens de la circulation. En réponse à la dilatation, les vaisseaux exercent une force inverse pour retourner à leur diamètre d'origine et ainsi pousser le flux dans le sens de la circulation. Le déplacement de ce dernier est donc, en réalité, la résultante de la somme des forces issues d'une composante stationnaire (contraction du ventricule) et d'une composante oscillatoire (dilatation/relaxation). La circulation pulmonaire est, en condition non pathologique, une circulation à haut débit/basse pression. L'équilibre de la combinaison des forces statiques et dynamiques repose sur la capacité du lit vasculaire à « emmagasiner » une partie du flux sanguin au moment de la systole et ainsi de limiter l'effort fourni par le ventricule droit qui possède une réserve contractile très limitée<sup>21</sup>. Si le lit vasculaire perd cette capacité, cela se répercute par une surcharge de pression au niveau du ventricule droit. Cette capacité de stockage s'évalue via deux paramètres, la compliance et impédance, qui dépendent directement des composantes statiques et oscillatoires du flux, là où le calcul de la RVP ne dépend que de la composante statique en négligeant donc la pulsatilité. De façon générale, l'impédance représente la mesure d'opposition d'un système à un flux oscillant, que ce soit en physique, en acoustique ou encore en électricité. Par convention, on parle de résistance dans le cas d'un système non-oscillant<sup>22-24</sup>.

L'impédance Z est définie par le ratio de la pression pulsatile P sur le flux pulsatile Q :

$$\text{Impédance (dyn. s. cm}^{-5}\text{)} = \frac{\text{Pression pulsatile (dyn. cm}^{-2}\text{)}}{\text{Flux pulsatile (cm}^3\text{. sec}^{-1}\text{)}}$$

Elle n'est pas directement mesurable et ne se donne pas sous la forme d'une simple valeur comme la RVP. En effet, elle se calcule à partir des courbes de pression et de débit en fonction du temps et se représente sous la forme de courbes desquelles différents paramètres peuvent être déduits<sup>25</sup>.

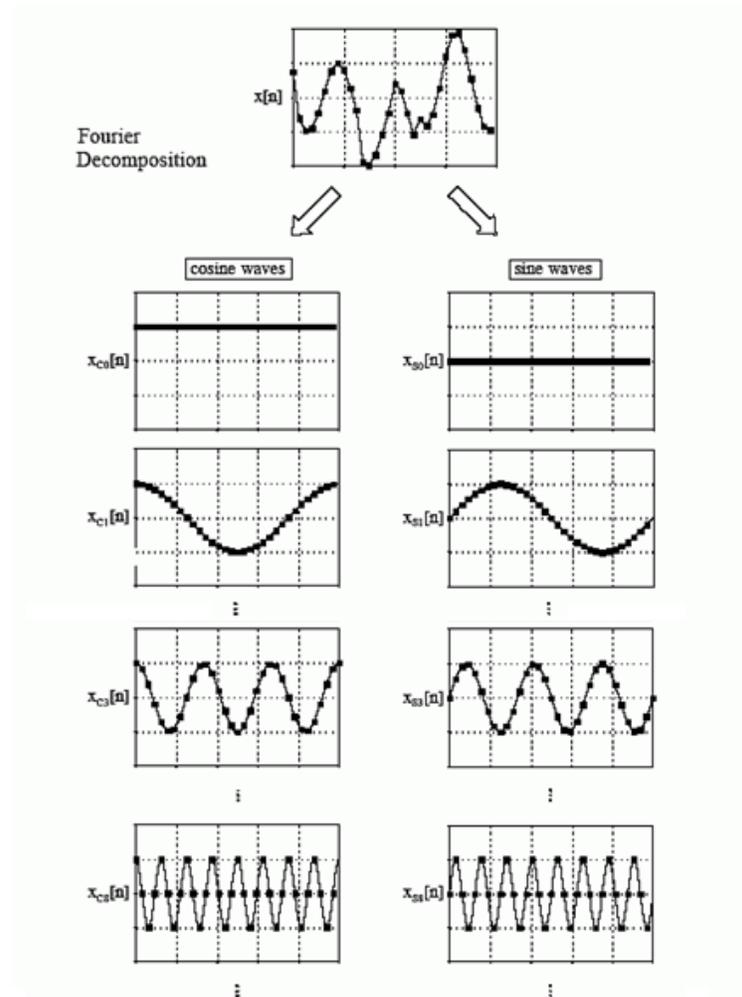
En considérant que les courbes de pression et de flux sont des ondes périodiques en fonction du temps, on peut utiliser une analyse de Fourier afin de les décomposer en une série d'harmoniques. Cette décomposition permet d'obtenir à partir d'une onde périodique complexe, une série d'ondes harmoniques distinctes d'amplitudes spécifiques et dont les fréquences sont des multiples de la fréquence du signal initial. L'addition de ces harmoniques redonne l'onde périodique complexe étudiée (Figure 7)<sup>26,27</sup>.



**Figure 7 : Décomposition d'un signal périodique en harmoniques par l'analyse de Fourier<sup>28</sup>.**

*Adapté de "Fourier Analysis and Transforms", Hearing Health Matters.*

D'un point de vue mathématique, cela revient à écrire la fonction décrivant l'onde périodique comme la somme de fonctions trigonométriques (sinus et cosinus) simples, tel qu'illustré ci-après (Figure 8).



**Figure 8 : Illustration d'une décomposition de Fourier<sup>26</sup>.**

*La décomposition de Fourier permet de décomposer une onde complexe en une série de fonctions sinus et cosinus simples.*

Pour ce faire, il convient de déterminer chaque fonction cosinus et sinus composant la fonction de l'onde étudiée à l'aide de la série de Fourier :

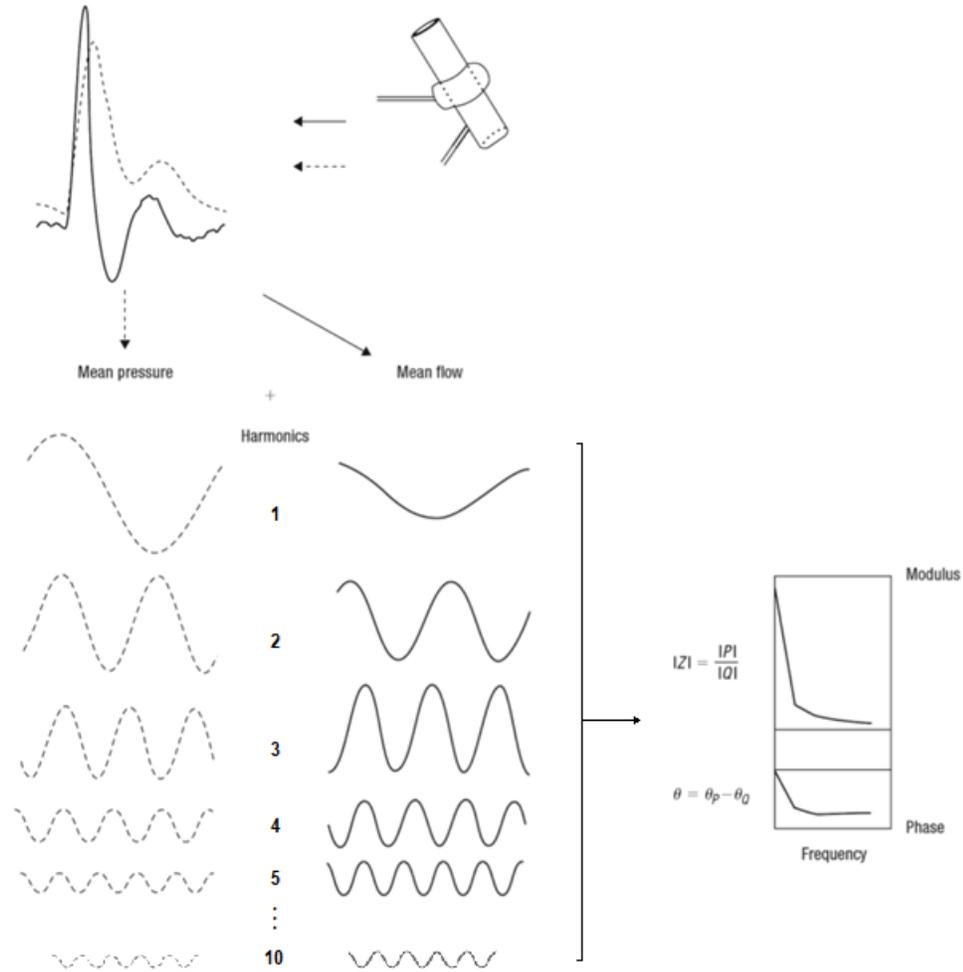
$$f(t) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left[ a_n \cos \left( nt \frac{2\pi}{T} \right) + b_n \sin \left( nt \frac{2\pi}{T} \right) \right]$$

Cette équation décrit le comportement d'une onde complexe de période  $T$  (et donc de fréquence  $\frac{1}{T}$ ) en fonction du temps  $t$ . Les coefficients  $a_0$ ,  $a_n$  et  $b_n$  sont appelés coefficients de Fourier. Le coefficient  $a_0$  représente l'onde à la fréquence 0 entre  $-\frac{T}{2}$  et  $\frac{T}{2}$  et s'interprète comme la moyenne de la fonction  $f(t)$ . Son équation est la suivante :

$$a_0 = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} f(t) dt$$

L'ensemble des coefficients calculés ( $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2...$  $a_n$  et  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3...$  $b_n$ ) correspondent à des fonctions d'harmoniques simples composant l'onde périodique complexe (Figure 8). Chacune de ces harmoniques possède une fréquence et une amplitude qui lui est propre<sup>27,29</sup>.

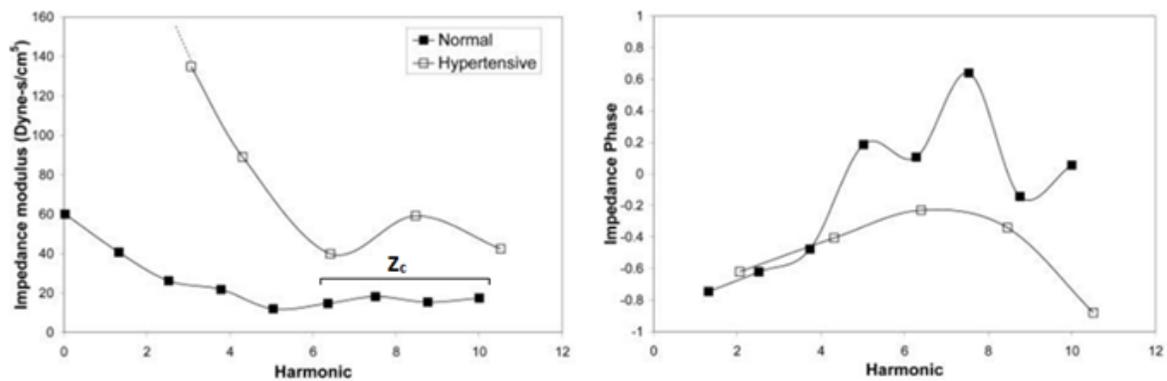
Dans le cas de l'impédance vasculaire pulmonaire, les courbes de flux et pression peuvent être obtenues de manière invasive par utilisation d'un cathéter muni d'un manomètre et d'un débitmètre à haute-fidélité. Les mesures pression/flux devant être précises et instantanées, l'utilisation de cathéters Swan-Ganz classiques pour mesurer le flux par thermodilution tel qu'utilisé de routine chez les patients atteints d'HTP n'est donc pas adaptée<sup>30</sup>. Il faudrait dans ce cas coupler la mesure de pression par cathétérisme cardiaque à une mesure de flux par échocardiographie Doppler. Les mesures en parallèle de la pression et du flux permettent d'établir des courbes de pression et volume durant les cycles systole/diastole. En les considérant comme des ondes périodiques, on peut alors utiliser une série de Fourier pour décomposer l'onde de flux et l'onde de pression en une suite d'harmoniques tel que décrit précédemment. Seules les premières sont nécessaires, car au-delà de la 10<sup>e</sup> harmonique, l'expérience a montré que celles-ci deviennent d'intérêt négligeable<sup>25,31</sup>. On calcule alors l'impédance, soit le ratio des amplitudes  $|Z| = \frac{|P|}{|Q|}$  pour chaque harmonique de fréquence donnée. À la fréquence 0, l'impédance  $Z_0$  (coefficient  $a_0$  dans la suite de Fourier) équivaut à la RVP mesurée lorsque l'on considère le flux sanguin continu. On calcule également le déphasage  $\theta = \theta_P - \theta_Q$  (la distance entre le pic de pression et celui de flux exprimée en angle de phase  $\theta$  en radian) entre les harmoniques de pression et de flux pour chacune des fréquences obtenue par l'analyse de Fourier<sup>22,23,31</sup>. En traçant une courbe reliant chaque valeur calculée en fonction de la fréquence de l'harmonique, on obtient alors 2 graphiques. Le premier représente l'amplitude (ou module) de l'impédance  $|Z|$  en fonction de la fréquence de l'harmonique. L'autre représente la phase  $\theta$  en fonction de la fréquence. L'ensemble du processus est récapitulé ci-après (Figure 9).



**Figure 9 : Détermination du module et de la phase de l'impédance par analyse de Fourier<sup>23</sup>.**

Cette représentation de l'impédance en courbes d'amplitude et de phase, plutôt qu'en valeur comme la RVP, permet d'évaluer le lien entre l'augmentation de la pression pulsée et l'augmentation du flux traversant le vaisseau, mais aussi d'évaluer l'influence des ondes de pression/flux réfléchies générées par la réflexion dans le sens contraire. Ainsi, les amplitudes aux basses fréquences représentent l'impédance soumise aux ondes réfléchies dans les vaisseaux résistants, celles aux moyennes fréquences correspondent à l'impédance dans les vaisseaux intermédiaires et enfin les valeurs aux fréquences les plus élevées indiquent l'impédance au niveau le plus proximal du point de mesure. La moyenne de ces dernières est appelée "impédance caractéristique"  $Z_c$  et correspond au ratio de l'inertie du sang face à la compliance des artères proximales. On considère que les ondes réfléchies sont négligeables à ce niveau. Le graphique de la phase de l'impédance en fonction des harmoniques permet d'évaluer le comportement des ondes de flux et de pression. Ainsi, si une harmonique de pression précède celle de flux, l'angle de phase est positif. À l'inverse, si l'harmonique de pression arrive après celle du flux, la phase sera négative.

Chez un individu sain, l'amplitude de l'impédance va chuter à partir de 0 Hz (valeur  $Z_0$ ) pour atteindre un premier minimum entre 2 et 4 Hz ( $2^e$  et  $4^e$  harmonique) puis remonter vers un second maximum avec un plateau présentant de légères fluctuations pour les plus hautes fréquences (Figure 10). Cette zone de plateau relatif correspond à l'impédance vasculaire sans l'influence des ondes réfléchies générées par le passage du flux dans les vaisseaux distaux. La phase va quant à elle être négative dans les premières harmoniques, indiquant que l'augmentation de pression devance celle du flux sanguin, puis devenir légèrement positive ou aux alentours de zéro aux fréquences plus élevées indiquant une déformation des vaisseaux avec le passage du sang (Figure 10). Dans le cas d'une HTP, l'amplitude de l'impédance est fortement augmentée à  $Z_0$  (indiquant une résistance au flux) et le restera dans toutes les harmoniques. La phase quant à elle restera toujours négative en augmentant progressivement puis en rediminuant vers les harmoniques les plus élevées indiquant que l'onde de flux précède fortement l'onde de pression, traduisant une plus forte résistance du vaisseau à la déformation (Figure 10)<sup>22,25,32</sup>.



**Figure 10 : Amplitude et phase de l'impédance mesurées chez un individu sain et un patient atteint d'HTP<sup>25,33</sup>.**

*Amplitude de l'impédance en dyn.s.cm<sup>-5</sup>; phase en rad; harmonique en Hz.*

L'obtention de  $Z_c$  est particulièrement intéressante, car elle permet d'évaluer la perte d'élasticité et le remodelage vasculaire au niveau des artères proximales. En effet, elle est dépendante de la densité  $\rho$  du sang, du module élastique  $E$  du vaisseau (plus la valeur est haute, plus celui-ci est rigide), de son épaisseur  $h$ , ainsi que du rayon  $r$  de la lumière vasculaire, selon la relation suivante<sup>34</sup> :

$$Z_c = \sqrt{\frac{\rho E h}{2\pi^2 r^5}}$$

Grâce à cette dernière équation, nous pouvons observer qu'une augmentation de l'épaisseur du vaisseau, de son module élastique ou d'une baisse du rayon de la lumière induit une augmentation de l'impédance caractéristique  $Z_c$ . Dans le cas de l'HTP décrit précédemment, l'augmentation du  $Z_c$  est donc le reflet d'une

augmentation de l'épaisseur du vaisseau et/ou une perte d'élasticité ne pouvant pas être compensée par la vasodilatation.

Enfin, le calcul de  $Z_c$  permet aussi d'évaluer le niveau de réflexion de l'onde qui augmente lorsque le flux circule mal dans le lit vasculaire. Pour cela, on utilise l'indice de réflexion d'onde pulsée  $\Gamma$ , calculé selon la formule suivante<sup>34</sup> :

$$\Gamma = \frac{Z_0 - Z_c}{Z_0 + Z_c}$$

Ces ondes de réflexion, signe d'une plus forte opposition au flux, sont augmentées dans le cas de patients atteints d'HTP, ce qui peut avoir un effet néfaste sur la postcharge ventriculaire droite<sup>34</sup>.

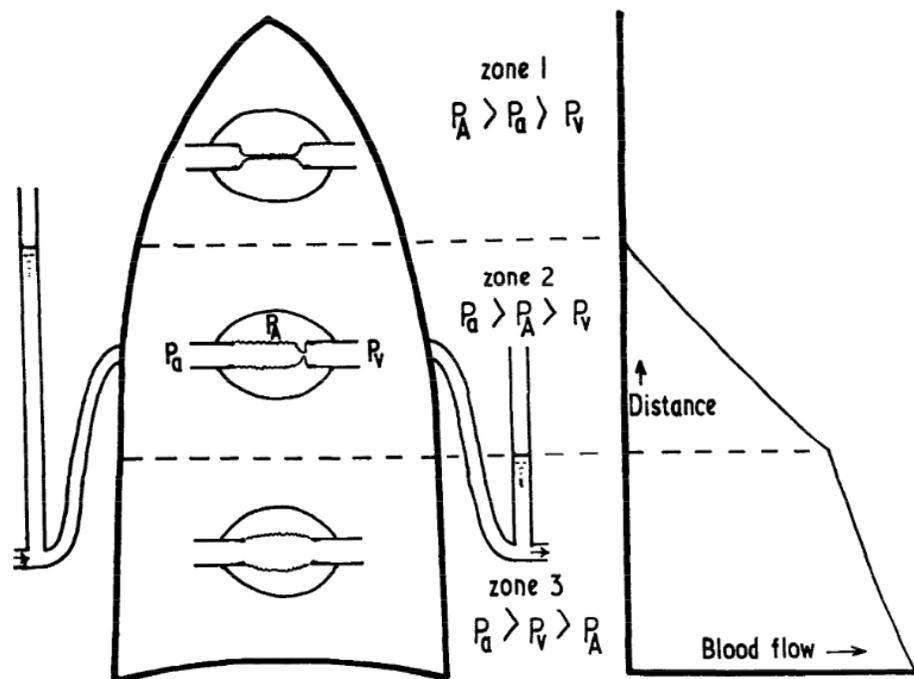
La puissance hydrostatique est essentiellement proximale, ce qui la rend peu sensible aux perturbations du flux dans le lit vasculaire distal. La valeur de  $Z_c$  est donc un bon marqueur de l'obstruction artérielle proximale due à un remodelage ou une vasoconstriction telle qu'observée en HTP. En prenant en compte les interactions dynamiques entre la RVP, l'élastance et les ondes réfléchies, l'impédance et les paramètres qui en découlent permettent de mieux quantifier la postcharge du ventricule droit en comparaison à la RVP seule<sup>22,30,35</sup>. Ces paramètres issus du calcul de l'impédance vasculaire sont encore peu utilisés en clinique en raison de leur complexité. Ils pourraient cependant permettre de mieux appréhender la santé vasculaire chez les patients atteints d'HTP.

### 3.2. Mécanismes de régulation passifs

Au repos, seulement une partie des capillaires sont utilisés pour les échanges gazeux. Les autres sont fermés, car la faible PAPm ne permet pas de maintenir une pression suffisante dans tous les capillaires pour résister aux forces hydrostatiques interstitielles qui leur sont appliquées. Il a été estimé que plus de la moitié des capillaires seraient dans cet état<sup>3</sup>.

La répartition des zones de perfusion au sein des poumons dépend également de la gravité. On peut ainsi se retrouver dans 3 cas, appelés zones de West, en fonction de l'équilibre entre les pressions artérielle, capillaire et veineuse et la pression alvéolaire (Figure 11). Dans le premier cas (zone 1), la pression alvéolaire est supérieure à la pression artérielle, provoquant la fermeture des capillaires. La zone sera ventilée, mais peu perfusée, c'est une zone d'espace mort. Cette zone n'existe pas chez les individus sains, car la pression artérielle est suffisante pour compenser la pression alvéolaire et à maintenir la perfusion de cette zone. Cependant, cette zone peut être observée en condition pathologique comme en cas d'hypovolémie par exemple. Dans la partie supérieure du poumon en position debout au repos (zone 2), la pression artérielle reste supérieure

à la pression alvéolaire, mais celle-ci est supérieure à la pression veineuse. Le capillaire restera ouvert, mais la veinule aura tendance à se refermer. Le sang veineux va alors retomber dans la veinule et créer un « effet cascade » qui, combiné à l'augmentation de la pression au niveau du capillaire, va rouvrir la veinule. Dans cette zone, le vaisseau s'ouvre et se referme par intermittence. Il s'agit de la zone optimale de ventilation-perfusion dans le poumon sain. Dans les parties inférieures du poumon (zone 3), le flux sanguin est tel que les pressions artérielle et veineuse sont supérieures à la pression alvéolaire. Le capillaire restera donc ouvert et le débit sanguin sera maximal<sup>36</sup>.



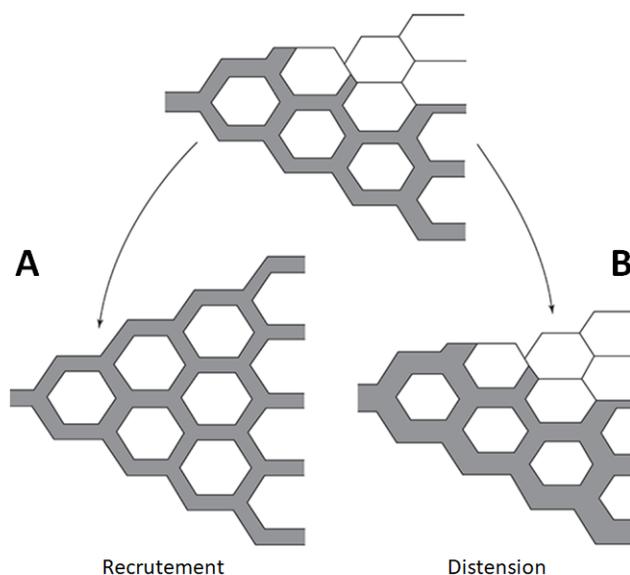
**Figure 11 : Effet de la gravité sur la circulation pulmonaire<sup>36</sup>.**

En position debout, le flux sanguin varie en fonction de la distance à la base du poumon. Chaque segment représente une zone de West. Les pressions alvéolaire ( $P_A$ ), artérielle ( $P_a$ ) et veineuse ( $P_v$ ) dépendent de la gravité. Zone 1 : lorsque  $P_A$  est supérieure à  $P_a$  et  $P_v$ , le capillaire est fermé. Cette zone n'existe pas chez un individu sain. Zone 2 : dans les parties supérieures du poumon, la  $P_a$  est supérieure à  $P_A$  ce qui permet au capillaire de rester ouvert. Cependant la  $P_v$  est inférieure à la  $P_A$ , ce qui ferme le capillaire du côté veineux. Il s'ouvre par intermittence lorsque la  $P_a$  augmente par accumulation de sang et que la  $P_A$  diminue lors de l'expiration. Zone 3 : la gravité favorisant le passage du sang dans la partie inférieure du poumon, la  $P_a$  et la  $P_v$  restent supérieures à la  $P_A$ , ce qui maintient le capillaire ouvert en permanence, maximisant le flux sanguin local.

Ces zones de perfusion n'ont pas de frontières anatomiques. En effet, la gravité et le débit sanguin varient constamment en fonction de l'activité ainsi que la dimension de chaque alvéole à chaque respiration.

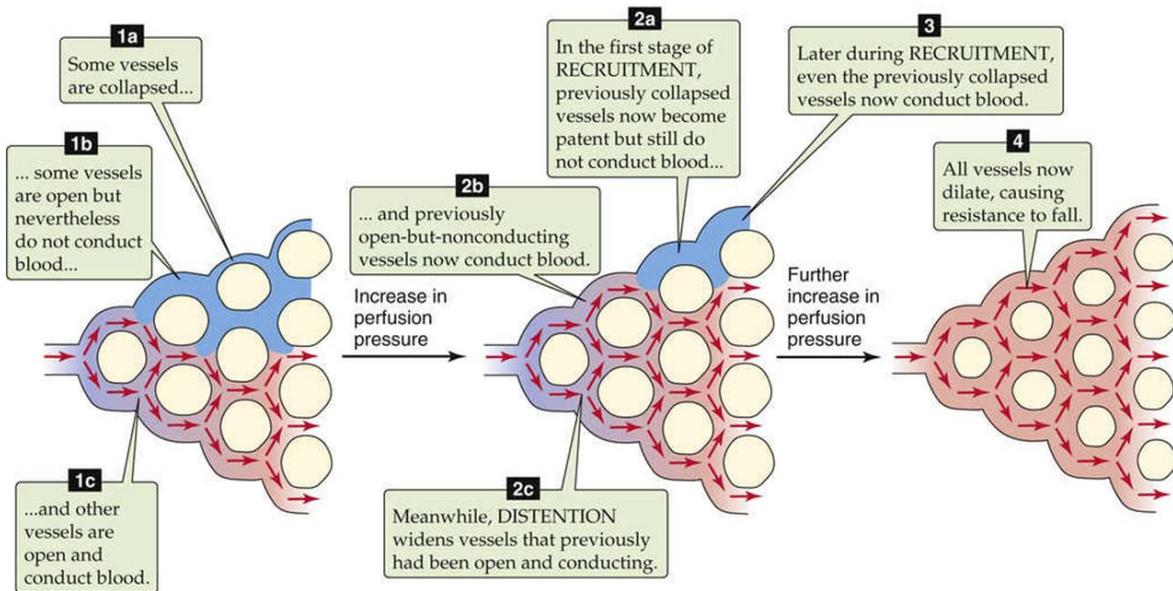
Durant un effort, le débit sanguin au sein du lit vasculaire pulmonaire va fortement augmenter. Cela peut résulter chez de jeunes athlètes sains à une augmentation de PAPO jusqu'à 25 mmHg. L'augmentation aberrante de la pression capillaire peut conduire à des œdèmes pulmonaires, à une modification des échanges gazeux ainsi qu'à des hémorragies pulmonaires<sup>16</sup>.

Chez un individu sain, l'augmentation de la PAPm va permettre à la pression capillaire d'excéder les pressions hydrostatiques interstitielles dans les vaisseaux fermés ou semi-fermés et provoquer leur ouverture complète. Le recrutement de nouveaux capillaires en fonction du flux va ainsi diminuer la RVP localement en augmentant le débit. Ce mécanisme de reperfusion permet d'augmenter les surfaces d'échanges gazeux en fonction de l'effort (Figure 12A). Un autre mécanisme de régulation de la pression vasculaire pulmonaire est la compliance de ces derniers. Comme décrit précédemment, les vaisseaux pulmonaires sont très peu musclarisés, ce qui les rend très extensibles. Une augmentation de la PAPm va induire une distension des vaisseaux qui, en augmentant leur diamètre, réduira ainsi la RVP et une fois de plus, augmentera leur débit localement (Figure 12B)<sup>3,37</sup>. Ces deux mécanismes ont lieu simultanément, ce qui permet au lit vasculaire pulmonaire de maintenir des RVP et des pressions normales face à l'augmentation du flux sanguin en cas d'effort. De plus, ceux-ci augmentent la surface d'échanges gazeux disponible afin de subvenir à la demande de l'organisme.



**Figure 12 : Illustration des mécanismes de recrutement et distension du lit vasculaire pulmonaire<sup>3</sup>.**

*A : mécanisme de recrutement des vaisseaux.; B : mécanisme de distension des vaisseaux.*



**Figure 13 : Dynamique de recrutement et distension des vaisseaux en fonction de la pression de perfusion sanguine<sup>37</sup>.**

Les mécanismes de recrutement/distension ont lieu simultanément pour augmenter les surfaces d'échanges en cas d'effort et maintenir les RVP à un seuil normal en cas d'augmentation du flux sanguin. Les portions bleues représentent les vaisseaux ne laissant pas circuler de sang. Les portions rouges représentent les vaisseaux transportant le sang dans le poumon. 1 : lit vasculaire pulmonaire au repos. Une partie des vaisseaux sont fermés (1a), d'autres sont ouverts, mais ne laissent pas circuler de sang (1b); une autre partie des vaisseaux transportent le sang (1c). 2 : Réponse du lit vasculaire pulmonaire lors d'un effort. Les vaisseaux inactifs sont recrutés en réponse à l'augmentation de pression sanguine : ceux fermés s'ouvrent sans permettre au sang de passer (2a), ceux déjà ouverts laissent circuler le sang (2b). En parallèle, les vaisseaux déjà utilisés pour la circulation sanguine se distendent pour faciliter le passage du sang (2c). 3 : Si la pression augmente à nouveau, les vaisseaux ouverts, mais ne laissant pas passer de sang, seront à leur tour recrutés. 4 : Lit vasculaire pulmonaire entièrement mobilisé lors d'un effort intense. Tous les vaisseaux ont été recrutés, seule la dilatation des vaisseaux permettra de faire baisser les RVP face à l'augmentation de la pression sanguine.

### 3.3. Mécanismes de régulation actifs

Le tonus de la circulation pulmonaire est également régulé de façon active par d'autres facteurs tels que des signaux nerveux, des messages humoraux et l'hypoxie. En effet, les artères et veines pulmonaires de diamètre supérieur à 30  $\mu\text{m}$  possèdent une innervation sympathique et parasympathique. Celle-ci concerne surtout les artères de plus gros calibre et est bien moins développée que celle de la circulation systémique. La stimulation des fibres parasympathique permet de diminuer la RVP par vasodilatation, alors que la stimulation des ganglions cervicaux sympathiques semble l'augmenter et ainsi réduire le flux sanguin de l'ordre de 30%<sup>3,10</sup>.

Le flux sanguin pulmonaire est également régulé par différentes molécules vasodilatatrices (monoxyde d'azote (NO), acétylcholine, agonistes  $\beta$ -adrénergiques, prostaglandine E<sub>1</sub>, prostacycline et bradykinine) ainsi que par

des molécules vasoconstrictrices (endothéline-1, sérotonine, adrénaline, noradrénaline, agonistes  $\alpha$ -adrénergiques, prostaglandine E2 et F2 $\alpha$ , thromboxane A2, angiotensine II et histamine)<sup>3,7</sup>.

La régulation du flux vasculaire pulmonaire dépend également du taux de dioxygène et de dioxyde de carbone alvéolaire. Il a été avancé que l'augmentation de la pression partielle en dioxygène alvéolaire (PAO<sub>2</sub>) (hyperoxie) ainsi que la baisse de la pression partielle en dioxyde de carbone alvéolaire (PACO<sub>2</sub>) (hypocapnie) auraient chacune un effet vasodilatateur sur la circulation pulmonaire<sup>38</sup>. À l'inverse, la baisse de la PAO<sub>2</sub> (hypoxie) de même que la hausse de la PACO<sub>2</sub> (hypercapnie) auraient un effet vasoconstricteur<sup>38,39</sup>. Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas complètement élucidés par manque de données expérimentales chez l'humain<sup>40</sup>. Le mécanisme moléculaire le mieux documenté est celui de la vasoconstriction hypoxique. Cette vasoconstriction est provoquée préférentiellement par l'hypoxie alvéolaire plutôt que par le manque de dioxygène intravasculaire qui, contrairement à la circulation pulmonaire, induit une dilatation des vaisseaux systémiques<sup>41</sup>. En condition normoxique, la chaîne respiratoire mitochondriale produit des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* – ROS) qui maintiennent un équilibre dans les réactions d'oxydoréduction, favorisant l'ouverture des canaux potassiques voltage-dépendants des cellules musculaires lisses. Cet état permet la sortie du potassium et maintient un potentiel membranaire inhibant les canaux calciques voltage-dépendants. Ceci empêche l'entrée de calcium Ca<sup>2+</sup>, menant à une hyperpolarisation normoxique de la cellule musculaire et favorisant la vasodilatation. En cas d'hypoxie alvéolaire, l'équilibre des réactions d'oxydoréduction est rompu, ce qui inhibe les canaux potassiques. Les ions K<sup>+</sup> s'accumulent alors dans la cellule ce qui modifie le potentiel membranaire et induit l'ouverture des canaux calciques. L'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> par ces pores provoque la contraction de la cellule musculaire lisse et la constriction du vaisseau<sup>40,42-44</sup>. Ce mécanisme de réponse à l'hypoxie alvéolaire permet de maintenir fermée la circulation pulmonaire chez le fœtus. Chez l'adulte, elle permet de dévier le sang des alvéoles qui ne contribuent pas aux échanges et de favoriser celles des zones bien ventilées pour optimiser l'oxygénation<sup>3,10,43</sup>. Ce mécanisme est également responsable de l'augmentation de la PAP induite par le manque d'oxygène en haute altitude. Il a ainsi été démontré que la vasoconstriction hypoxique pouvait augmenter de 50% la RVP lorsque la PAO<sub>2</sub> était inférieure à 50 mmHg<sup>45</sup>.

La vasoréactivité induite par la PACO<sub>2</sub> est moins bien connue. L'hypercapnie et l'hypocapnie sont respectivement des inducteurs de vasoconstriction et vasodilatation pulmonaires<sup>38,39</sup>. Les mécanismes moléculaires sont peu connus et interfèrent également sur le pH qui est aussi un régulateur du tonus vasculaire pulmonaire. Ainsi, l'hypoventilation et l'hyperventilation faisant varier la concentration de dioxyde de carbone dissous dans le sang et donc d'acide carbonique, feront varier le pH sanguin tel qu'illustré par l'équation de Henderson-Hasselbach. Ces variations pourront résulter en une acidose ou en une alcalose de cause respiratoire. Or l'acidose, qu'elle soit de cause respiratoire ou métabolique, est vasoconstrictrice au niveau pulmonaire. De même, l'alcalose respiratoire ou métabolique aura dans les deux cas un effet vasodilatateur. La

PCO<sub>2</sub> semble donc avoir un effet sur le tonus vasculaire *via* la concentration extracellulaire de proton H<sup>+</sup>. Cependant, il a été démontré chez l'animal que la vasoconstriction hypercapnique pouvait avoir lieu même en cas de normalisation du pH par perfusion de bicarbonate de sodium<sup>46</sup>. Dans cette étude, les auteurs ont observé que l'hypercapnie avec acidose induisait une vasoconstriction plus tardive, mais plus forte que celle avec pH normal. De plus, ils ont rapporté une amélioration de la vasoconstriction en condition hypercapnique avec acidose lorsqu'ils inhibaient la voie de l'oxyde nitrique, ce qui n'était pas le cas lorsque le pH était normal. Cela suggère que l'hypercapnie a un effet vasoconstricteur indépendamment du pH, et que les deux conditions agissent par des mécanismes moléculaires distincts<sup>46</sup>. L'hypocapnie semble à l'inverse avoir un effet vasodilatateur en provoquant notamment de l'alcalose sanguine. L'hypocapnie induite par hyperventilation a été rapportée comme bénéfique pour la diminution de la PAP et l'amélioration des échanges gazeux en condition hypoxique, mais là encore les mécanismes moléculaires demeurent obscurs<sup>47</sup>.

# Chapitre 1. L'hypertension pulmonaire (HTP)

## 1.1 Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une vasculopathie définie par une élévation des pressions et des résistances vasculaires pulmonaire. Elle se caractérise par une pression moyenne dans l'artère pulmonaire supérieure à 20 mmHg<sup>48</sup>. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une forme distincte d'HTP. Dans celle-ci, l'augmentation des résistances vasculaire est due à une dysfonction et à un remodelage des parois vasculaires partant de façon rétrograde des artérioles précapillaires aux artères de plus gros calibre. Ce remodelage excessif provoque l'oblitération progressive de la lumière artérielle et l'augmentation des résistances et des pressions vasculaires pulmonaires. Cela se traduit par une PAPm supérieure à 20 mmHg avec une RVP supérieure à 3 WU, mais avec une PAPO inférieure à 15 mmHg reflétant l'absence d'hypertension dans les vaisseaux veineux. Le surplus d'effort que doit fournir le ventricule droit afin de maintenir un débit constant conduit à une hypertrophie de celui-ci, et ultimement à une défaillance cardiaque. L'HTAP est une maladie rare (15-50 cas par million d'habitants), et ses symptômes non spécifiques permettent de supposer qu'elle reste sous-diagnostiquée. En effet, les patients ne présentent le plus souvent qu'une dyspnée et une fatigue chronique, allant parfois à des douleurs thoraciques, un œdème des membres inférieurs, des lipothymies et des syncopes, ce qui conduit à une errance diagnostique.

## 1.2 Classification

Les différentes formes d'HTP sont classées en fonction de l'étiologie et des mécanismes physiopathologiques. Initiée lors du second congrès mondial d'hypertension pulmonaire d'Évian en 1998, la classification fut récemment mise à jour lors du congrès de Nice en 2018 et permet de distinguer 5 groupes. Le groupe 1 comprend les HTAP dont la cause primaire est un remodelage artériel pulmonaire aberrant, mais également celles pour lesquelles le remodelage touche à la fois les lits artériel, capillaire et veineux (maladie veino-occlusive pulmonaire [MVOP] et hémangiomatose capillaire [HCP]), ainsi que l'hypertension persistante du nouveau-né. Les autres groupes comprennent les HTPs consécutives à d'autres pathologies. Ainsi, le groupe 2 rassemble les HTP induites par une cardiopathie gauche; le groupe 3, celles secondaires à une maladie respiratoire chronique et/ou à l'hypoxie; le groupe 4, celles associées à une obstruction du lit artériel par des thrombo-embolies chroniques, et le groupe 5, les HTPs de mécanismes indistincts et multifactoriels (troubles métaboliques, hématologiques, etc.)<sup>48,49</sup>. Chaque groupe comprend différentes sous-catégories selon la pathologie ou le mécanisme impliqué dans la pathogenèse de l'HTP. Chaque sous-catégorie a un traitement et un pronostic qui lui est propre. Dans cet ouvrage, seul le groupe 1 sera revu en détail. Au sein de ce groupe, se distinguent les HTAP de forme 1) idiopathique (sans facteur de risque associé connu), 2) héréditaires (associée

à une mutation dans les gènes BMPR2, ALK-1, ENG, Smad9, CAV1, KCNK3, etc.) ou familiales sans mutation connue, 3) induite par la prise de médicaments ou de substances toxiques, 4) associée à d'autres pathologies (connectivites, infection par le VIH, hypertension portale, cardiopathie congénitale et schistosomiase), 5) les HTAP de patients répondant à long terme aux bloqueurs des canaux calciques, 6) la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hémangiomasose capillaire pulmonaire (MVOP/HCP) touchants aussi les lits capillaires et veineux et enfin, 7) l'HTP persistante du nouveau-né<sup>48</sup>. L'ensemble de la classification des HTP et HTAP est récapitulée dans le tableau suivant (Tableau 1) :

**Tableau 1 : Classification des HTP mise à jour lors du Congrès de Nice 2018.**

*MVOP : maladie veino-occlusive pulmonaire; HPC : hémangiomasose capillaire pulmonaire. D'après Simonneau et al. 2019<sup>48</sup>.*

<b>Classification des hypertensions pulmonaires – Classification de Nice 2018</b>
<p><b>1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)</b></p> <p>1.1 HTAP idiopathique</p> <p>1.2 HTAP héritable</p> <p>1.3 Induite par des médicaments ou des toxiques</p> <p>1.4 Associée à :</p> <p>    1.4.1 <i>Connectivites</i></p> <p>    1.4.2 <i>Infection HIV</i></p> <p>    1.4.3 <i>Hypertension portale</i></p> <p>    1.4.4 <i>Cardiopathies congénitales</i></p> <p>    1.4.5 <i>Schistosomiase</i></p> <p>1.5 HTAP répondant aux inhibiteurs de canaux calciques sur le long terme</p> <p>1.6 HTAP avec des caractéristiques manifestes d'atteinte capillaire et veineuse (MVOP/HCP)</p> <p>1.7 HTP persistante du nouveau-né</p> <p><b>2. Hypertension pulmonaire des cardiopathies gauches</b></p> <p>2.1 Dysfonction systolique du ventricule gauche</p> <p>2.2 Dysfonction diastolique du ventricule gauche</p> <p>2.3 Valvulopathies</p> <p>2.4 Anomalies cardiovasculaires congénitales ou acquises menant à une HTP post-capillaire</p> <p><b>3. Hypertension pulmonaire associée à des maladies pulmonaires et/ou hypoxémiantes</b></p> <p>3.1 Maladie pulmonaire obstructive</p> <p>3.2 Maladie pulmonaire restrictive</p> <p>3.3 Autres maladies pulmonaires à la fois restrictives et obstructives</p> <p>3.4 Hypoxie sans maladies pulmonaires</p> <p>3.5 Anomalies du développement pulmonaire</p> <p><b>4. HTP due à une obstruction des artères pulmonaires</b></p> <p>4.1 HTP thromboembolique chronique</p> <p>4.2 Autres causes d'obstruction</p> <p><b>5. Hypertension pulmonaire de mécanismes multifactoriels et/ou incertains</b></p> <p>5.1 Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndrome myéloprolifératif, splénectomie</p> <p>5.2 Troubles systémiques (sarcoïdose, histiocytose pulmonaire à cellules de Langerhans, lymphangioliomyomatose) ou métaboliques (glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdie)</p> <p>5.3 Autres</p> <p>5.4 Maladies cardiaques congénitales complexes.</p>

### 1.2.1 HTAP idiopathique

Les HTAP idiopathiques (HTAPi) représentent les HTAP sans cause connue expliquant l'apparition initiale du remodelage vasculaire anormal. Elles représentent entre 39 et 48% des HTAP selon les cohortes, avec un âge moyen au diagnostic autour de 50-53 ans et une prédominance féminine de 1.7 :1<sup>50-52</sup>. Selon le registre REVEAL, le taux de survie à 5 ans est de 64,3%<sup>53</sup>.

### 1.2.2 HTAP héréditaire

Les HTAP héréditaires (HTAPh) regroupent les HTAP familiales (HTAPf) (plusieurs cas d'HTAP au sein d'une même famille) et les HTAPi associées à une mutation génétique. Dans 80% des HTAPf, il s'agit d'une mutation sur le gène *bmpr2* (*bone morphogenic protein receptor type 2*), qui code pour un récepteur appartenant à la super famille TGF- $\beta$  (tumor growth factor). Cette famille de facteurs de croissance et de cytokines semble jouer un rôle central dans le développement de l'HTAP. En effet, 5% des patients avec HTAPh présentent des mutations altérant l'expression d'autres gènes de cette super famille, comme *alk1* (*activin-like receptor kinase-1*), *eng* (*endoglin*), et *Smad 9* (*mothers against decapentaplegic 9*). D'autres mutations ont également été identifiées pour des gènes n'ayant aucun lien avec les voies de signalisation TGF- $\beta$ . La première sur le gène *kcnk3* altère la formation de canaux potassiques impliqués dans le tonus vasculaire et le potentiel de repos des cellules musculaires. La seconde, sur *cav1*, altère l'expression de cavéoline-1, une protéine régulant l'endocytose et la transcytose dans les cellules endothéliales. Enfin, les mutations sur le gène *TBX4* (*T-box 4*) ont été identifiées comme impliquées dans le développement de l'HTAP chez l'enfant<sup>54,55</sup>. Une récente étude sur plus de 1000 patients a permis de confirmer et de quantifier l'apparition de variations délétères de ces gènes chez les patients : *Bmpr2* (15,3%), *Tbx4* (1,3%), *Acvr1* (0,9%), *Eng* (0,6%), *Smad9* (0,4%) et *kcnk3* (0,4%)<sup>56</sup>. Cette étude a également identifié de nouvelles mutations possiblement impliquées dans l'HTAP sur les gènes *Atp13A3* (ATPase 13A3), *Sox17* (SRY-box 17), *Aqp1* (aquaporine 1) et *Gdf2* (*growth differentiation factor 2* codant pour la protéine BMP-9) chez respectivement 1,1%, 0,9%, 0,9% et 0,8% des patients<sup>54,56,57</sup>.

Néanmoins, les mutations seules ne suffisent pas à l'apparition de l'HTAP. Seuls 20% des porteurs de mutation sur le gène *bmpr2* développeront une HTAP malgré une transmission autosomale dominante. De plus, il y a une plus forte prédominance des HTAPh chez les femmes pour certaines mutations (ratio 3.5 :1 pour *alk1*). Ces données suggèrent une origine multifactorielle au développement de l'HTAP<sup>58</sup>.

La présence de ces mutations génétiques est un critère à prendre en considération pour le pronostic et la prise en charge des patients HTAPh. Les patients avec mutations sur le gène *bmpr2* sont en moyenne 10 ans plus jeunes lors du diagnostic et répondent mal aux traitements vasodilatateurs usuels. Les patients ayant une

mutation sur *alk1* auront, quant à eux, une HTAPh en très jeune âge, avec un tiers des patients de moins de 16 ans et un pronostic beaucoup plus sombre. Le taux de survie à 5 ans des patients HTAPh est de 60,1%<sup>53</sup>.

### 1.2.3 HTAP induite par des médicaments ou substances toxiques

La prise de certains médicaments ou substances toxiques peut induire le développement d'une HTAP. La classification actuelle présente ceux-ci selon le risque certain ou possible entre l'exposition et le développement de la maladie. Les premiers cas d'HTAP liés à la prise de médicament ont été documentés dans les années 1960 durant la période de commercialisation du fumarate d'aminorex (Ménocil®), une amphétamine utilisée comme anorexigène. Durant celle-ci, la prévalence des cas d'HTAP a été multipliée par 20 dans la seule ville de Berne en Suisse, et un retour à la normale n'a été possible qu'après le retrait du médicament du marché<sup>59</sup>. On estime que le risque relatif de développer une HTAP est de 52 :1 pour les patients ayant reçu du Ménocil par rapport à la population générale. L'association amphétamine-HTAP a ensuite été confirmée avec d'autres épidémies d'HTAP coïncidant avec l'apparition de la fenfluramine (Pondéral®), utilisée en association avec la phentermine dans le traitement anorexigène « Fen-phen », ou encore lors la commercialisation en France du benfluorex (Médiator®). Chacune de ces explosions de cas d'HTAP a été endiguée à la suite de l'interdiction de ces molécules utilisées dans le traitement de l'obésité<sup>60,61</sup>.

Parmi les autres molécules pharmaceutiques connues pour induire l'HTAP, les inhibiteurs de tyrosine kinase occupent une place controversée. Ces glycoprotéines transmembranaires servent de récepteurs pour différents facteurs extracellulaires impliqués dans la prolifération, la survie, la migration, le métabolisme et les mécanismes de différenciation cellulaire. Initialement prescrits pour traiter des pathologies telles que les maladies myéloprolifératives, les effets antiprolifératif et proapoptotique des inhibiteurs de tyrosine kinase en ont fait des candidats prometteurs pour lutter contre la progression du remodelage vasculaire observé dans l'HTAP. En raison des nombreux effets secondaires et risques associés à ces molécules, et au manque de données probantes, elles ne sont pas utilisées pour le traitement de l'HTAP<sup>62-64</sup>. Par ailleurs, plusieurs cas d'HTAP ont été rapportés chez les patients ayant un traitement chronique de dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé chez les patients résistants à l'imatinib. Si l'arrêt du traitement permet une amélioration des symptômes, une étude sur le long terme révèle que l'HTAP persiste pour 37% des patients ayant développé une HTAP sous traitement par dasatinib<sup>65</sup>. Tous ces éléments ont permis de classer les amphétamines et méthamphétamines, ainsi que le dasatinib, comme inducteurs certains de l'HTAP, aux côtés de l'huile de canola frelatée responsable d'une épidémie d'hypertension pulmonaire au début des années 1980 en Espagne<sup>48</sup>.

D'autres molécules sont également suspectées d'induire l'HTAP comme la cocaïne, le L-tryptophane, les interférons  $\alpha$  et  $\beta$ , ou encore les agents alkylants, mais les preuves scientifiques sont actuellement insuffisantes pour établir un lien définitif. Le taux de survie des patients avec HTAP induite est de 73,5% à 5 ans<sup>53</sup>.

## 1.2.4 HTAP associée à diverses pathologies

Dans de nombreux cas, l'HTAP peut apparaître comme une complication d'une pathologie déjà présente sans qu'il y ait d'atteinte pulmonaire ou cardiaque gauche sous-jacente.

### 1.2.4.1 *Connectivites*

Le développement d'une HTAP peut apparaître dans un contexte de maladie auto-immune des tissus conjonctifs. C'est une complication relativement fréquente atteignant les patients souffrant de sclérodermie avec une fréquence allant de 7 à 12% selon les estimations<sup>49</sup>. Le lien entre l'HTAP et la sclérodermie peut s'expliquer par un recoupement de nombreux mécanismes physiopathologiques (inflammatoires, profibrosants et auto-immun) communs aux deux maladies. Ces patients ont un pronostic plus sombre que les patients souffrants d'HTAPi, et répondent moins bien aux traitements<sup>66</sup>. Cependant, la complexité et la diversité des phénotypes observés chez les patients souffrant de sclérodermie laissent supposer la présence de différents phénotypes d'hypertension pulmonaire induits, ce qui complexifie l'étude de cette condition. Ainsi, la sclérodermie est classiquement classée en forme limitée ou diffuse, et peut atteindre différents organes tels que la peau, les poumons, le cœur, les reins, les muscles et les articulations. Si l'HTAP complique les deux formes de sclérodermie, elle semble avoir une plus forte incidence chez les patients atteints de la forme limitée cutanée. La sclérodermie peut donc donner lieu à des HTAP de groupe 1 par une atteinte des vaisseaux pré- ou post-capillaire, de groupe 2 par une atteinte cardiaque, ou encore de groupe 3 par une atteinte interstitielle. La variété de ces mécanismes peut expliquer la différence de réponse aux traitements<sup>66,67</sup>. Le taux de survie à 5 ans des patients souffrants d'HTAP associée à une connectivite est de 43,7%<sup>53</sup>.

### 1.2.4.2 *Infection au VIH*

L'HTAP est aussi une complication bien connue chez les porteurs du VIH avec une incidence de 0,5%. Si en l'absence de traitements antiviraux les patients VIH-HTAP ont une espérance de vie limitée avec 50% de mortalité à 1 an, les avancées dans la prise en charge médicamenteuse ont permis d'atteindre une survie à 5 ans supérieure à 70%, et même une guérison de l'HTAP dans 20% des cas après un traitement de plusieurs années<sup>68,69</sup>.

### 1.2.4.3 *Hypertension portale*

Certaines pathologies hépatiques comme les cirrhoses peuvent conduire à une augmentation de la pression au niveau de la veine porte. Selon les estimations, de 2 à 6% des patients atteints d'hypertension portale développent une HTAP appelée hypertension porto-pulmonaire. La survenue de celle-ci ne dépend pas de la sévérité de l'hypertension portale ou encore de la maladie sous-jacente. D'après le registre français de l'hypertension pulmonaire, les patients ayant une hypertension porto-pulmonaire et une cirrhose ont un taux de

survie moyen de 68% sur 5 ans<sup>70</sup>. Ce taux de survie tombe à 40% dans le registre états-unien REVEAL, ce qui peut s'expliquer par une représentation plus importante de cirrhose de stades plus avancés<sup>49,53,71</sup>.

#### 1.2.4.4 *Cardiopathies congénitales*

Dans 0,8% des naissances, le nouveau-né présente une cardiopathie congénitale. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une communication entre les circulations sanguines systémique et pulmonaire. Ces malformations comprennent les communications interventriculaires, les communications interauriculaires et la persistance du canal artériel (entre l'artère pulmonaire et l'aorte). D'autres cardiopathies plus rares peuvent également entraîner une HTP (canal atrio-ventriculaire, fistules aorto-pulmonaire, etc.). Toutes ces anomalies ont pour conséquence une augmentation du débit et/ou de la pression au niveau du lit vasculaire pulmonaire qui peut mener au développement d'une HTAP dans 10% des cas<sup>72</sup>. La sévérité de l'hypertension dépend du type de malformation congénitale. Ainsi, les anomalies telles qu'une communication interventriculaire ou la persistance du canal artériel qui induisent une hausse combinée des pressions et débits sanguins pulmonaires présenteront une incidence accrue des cas d'HTAP comparativement à celle n'augmentant que les volumes. Si l'HTAP est une complication commune, elle n'est pas systématique, ce qui suggère encore une fois l'implication d'autres facteurs dans la pathogenèse. La fermeture chirurgicale de la communication permet de réduire grandement l'incidence de l'HTAP, surtout si elle est pratiquée tôt dans la vie. Cela indique qu'une fois un certain seuil de lésions vasculaires atteint, l'HTAP peut se développer et s'autoentretenir indépendamment de la cardiopathie. Les patients ayant une HTAP sévère irréversible initiée par leur cardiopathie congénitale dont le shunt est renversé (c'est-à-dire un shunt initialement gauche-droit devenu droit-gauche en raison des pressions pulmonaires élevées) et causant de la cyanose, sont dits souffrants du syndrome d'Eisenmenger.

Les patients souffrant d'une cardiopathie congénitale avec HTAP peuvent se retrouver dans 3 cas de figure. Soit les patients sont diagnostiqués très tôt après leur naissance et ne présentent pas encore de lésions vasculaires sévères. Dans ce cas, on observe une augmentation du débit au niveau pulmonaire avec des résistances vasculaires pulmonaires basses. Le traitement chirurgical de la cardiopathie suffit alors généralement à guérir l'HTP s'il est effectué précocement. Ensuite, les patients ayant une résistance vasculaire pulmonaire légèrement élevée présentent un plus haut risque chirurgical. L'opération, si elle est possible, permet d'améliorer grandement la qualité de vie des patients. Cependant, certains patients peuvent avoir des lésions vasculaires persistantes et développer une HTAP semblable à la forme idiopathique. Ces patients ont alors une survie plus courte que s'ils n'avaient pas eu de chirurgie réparatrice. Le troisième cas de figure comprend les patients atteints du syndrome d'Eisenmenger, c'est-à-dire avec une HTAP déjà sévère et persistante initiée par leur cardiopathie congénitale. Ces patients présentent des pressions et résistances vasculaires pulmonaires élevées et ne sont plus opérables. En effet, les pressions dans le ventricule droit sont telles que la réparation de la communication droite-gauche provoquerait une importante défaillance cardiaque droite. La seule option

est alors une transplantation cardio-pulmonaire, comme dans le cas d'une HTAP idiopathique sévère ou, si le ventricule droit n'est pas trop endommagé, de procéder à une transplantation pulmonaire tout en réparant simultanément la cardiopathie congénitale<sup>50,72-75</sup>.

#### 1.2.4.5 *Schistosomiase*

La schistosomiase est une maladie parasitaire particulièrement présente en Afrique subsaharienne. Elle est la résultante d'un contact avec de l'eau infestée par des Schistosomas, des vers hémophages. Ces vers ont un cycle de vie complexe, ayant pour hôte intermédiaire des mollusques aquatiques et pour hôtes définitifs des mammifères. Les parasites, une fois dans la circulation, migrent dans différents tissus et provoquent une réaction inflammatoire et la formation de granulomes. Cette réaction entraîne en une fibrose et en un remodelage des vaisseaux sanguins (artérioles pulmonaires dans les poumons et veinules porte dans le foie). Ce remodelage, au niveau pulmonaire, peut s'accompagner d'une hypertrophie intimale, médiale et adventitielle sévères, ainsi que d'une inflammation chronique du lit vasculaire pulmonaire qui peut favoriser le développement d'une HTAP. Au niveau hépatique, cela peut mener à une fibrose et une hypertension portale, voire à une hypertension porto-pulmonaire<sup>76-78</sup>.

L'Organisation Mondiale de la Santé estime que la schistosomiase touchait 206 millions de personnes à travers le monde en 2016 et que seulement 89,2 millions avaient reçu un traitement<sup>79</sup>. Environ 4-8% des patients développeraient une maladie hépatosplénique associée à une schistosomiase chronique. Environ 5% de ces derniers développeront une HTAP. Cette HTAP semble comparable à l'hypertension porto-pulmonaire sans antécédent de schistosomiase. Les patients développant l'HTAP ont un taux de mortalité atteignant 15% sur 3 ans<sup>49,80</sup>.

#### 1.2.5 HTAP répondant aux bloqueurs des canaux calciques

La classification de 2018 a fait apparaître ce nouveau groupe d'HTAP. Une minorité de patients souffrant d'HTAP démontrent une sensibilité aux bloqueurs des canaux calciques, pouvant améliorer grandement leur qualité de vie et leur survie. Cette sensibilité est déterminée lors d'un test de vasoréactivité durant lequel la réponse hémodynamique suite à l'inhalation de NO ou d'iloprost, ou suite à l'administration intraveineuse d'epoprostenol ou d'adénosine est vérifiée. Si la substance vasodilatatrice fait diminuer la PAPm de plus de 10 mmHg et que la PAP diminue en dessous de 40 mmHg, avec ou sans augmentation du débit cardiaque, le patient est dit « répondeur » et est candidat à ce traitement d'entretien. Les patients sont dits « répondeurs à long terme » si l'effet bénéfique des bloqueurs des canaux calciques permet d'améliorer la sévérité de l'HTAP vers une classe I ou II (d'après la classification fonctionnelle de la New York Heart Association) durant au moins un an<sup>48</sup>. La spécificité de ce phénotype pointe vers des mécanismes pathologiques particuliers, qui semblent être confirmés

par la présence de certains variants génétiques ainsi que d'un profil d'expression de l'ARN circulant particulier chez les patients « répondeurs »<sup>81,82</sup>.

### 1.2.6 HTAP avec atteinte capillaire et veineuse (MVOP/HCP)

La MVOP et l'HCP sont très similaires, et la distinction entre les 2 pathologies est sujette à controverse. Ce sont des formes très rares (0,1-0,2 cas par million d'après le registre français d'hypertension artérielle pulmonaire) et très sévères d'HTAP, touchants principalement les lits capillaires et veineux et, ultimement, artériels pulmonaires. Elles se caractérisent par une artériolisation des veines et veinules pulmonaires, avec un épaissement de la média et l'apparition de nouvelles couches élastiques, ainsi que par la formation d'une néointima. Comme dans le cas de l'HTAP, le remodelage vasculaire va mener à l'oblitération des vaisseaux et à l'augmentation progressive des RVP. L'augmentation des RVP au niveau des veines et veinules induit une augmentation des pressions de façon rétrograde dans le lit capillaire. Ce dernier va alors se dilater, s'épaissir et proliférer, formant ainsi des zones dites « d'hémangiomatose capillaire ». Enfin, le remodelage va atteindre le lit artériel qui sera similaire au remodelage observé dans l'HTAP, à l'exception des lésions plexiformes. Ce remodelage est accompagné également d'œdème interstitiel et de fibrose septale interlobulaire<sup>83-85</sup>.

Contrairement à l'HTAPi, la MVOP semble toucher indifféremment les 2 sexes. Cependant, les fortes similitudes entre les 2 pathologies ainsi que la signature hémodynamique similaire (PAPm supérieure à 20 mmHg, PAPO inférieure à 15 mmHg et RVP supérieure à 3 WU) peuvent rendre le diagnostic plus difficile. On estime que 5 à 10% des cas initialement diagnostiqués en HTAPi se révèlent être des MVOP. Or, la prise en charge des patients MVOP avec des traitements vasodilatateurs similaires à ceux employés dans l'HTAP peut mener à la formation d'œdèmes pulmonaires et mandate une instauration progressive et prudente de ces traitements. La biopsie pulmonaire permet de poser le diagnostic. Toutefois, cette méthode est contre-indiquée chez les patients avec atteinte sévère. En l'absence de biopsie, le diagnostic se fait donc par l'identification d'une hypertension précapillaire par cathétérisme cardiaque droit associée à des signes cliniques et radiologiques : abaissement important de la DLCO, épaissement des septa interlobulaires, opacités en verre dépoli ou encore opacités nodulaires centrolobulaires et adénopathies médiastinales. La transplantation pulmonaire demeure le seul moyen de guérir les patients<sup>84,85</sup>.

Les mécanismes pathologiques de la MVOP sont encore très peu étudiés. On peut cependant en distinguer 4 types : la forme idiopathique, la forme héréditaire, la MVOP associée à une connectivite, et enfin la MVOP consécutive à une exposition à une drogue ou un toxique. Comme pour l'HTAPi, la forme idiopathique de la MVOP regroupe les cas sans cause connue identifiée. La forme héréditaire est due à des mutations génétiques favorisant le développement de la pathologie. Actuellement, des mutations bi-allélique sur le gène *EIF2AK4* ont été identifiées comme un facteur de risque au sein de familles avec consanguinité. La présence de ces mutations

sur ce gène est associée avec le développement plus précoce de la maladie (âge médian 26 ans [de 0 à 50,3 ans] contre 60 ans [6,7-81,4 ans] pour les patients sans mutation) mais ne semble pas influencer sur la sévérité au diagnostic ni sur la survie<sup>86</sup>. La forme induite par des toxiques a longtemps été suspectée dans le cas de chimiothérapie. Il a ainsi été rapporté, depuis les années 1980, différents cas suspects de patients développant une MVOP à la suite d'une chimiothérapie utilisée dans le cadre d'une greffe de moelle osseuse ou du traitement de cancers<sup>87-90</sup>. Le lien de cause à effet a récemment été démontré chez 2 agents alkylants (cyclophosphamide et mitomycine) utilisés en chimiothérapies animales, ce qui a permis d'établir les premiers modèles de MVOP expérimentales<sup>91,92</sup>.

L'exposition à des solvants est également un facteur de risque pour la MVOP. L'exposition au trichloréthylène, utilisé pour le nettoyage à sec des vêtements et le dégraissage de pièces métalliques, a récemment été identifiée comme un facteur de risque potentiel<sup>93,94</sup>.

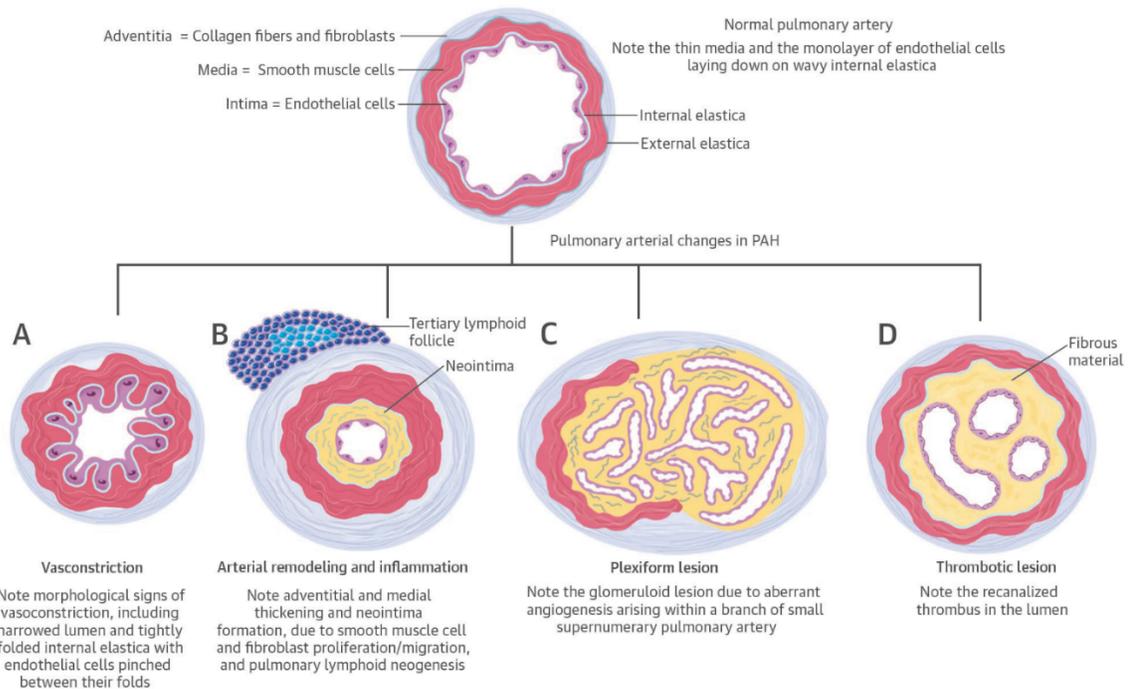
### 1.2.7 HTP persistante du nouveau-né

L'HTP persistante du nouveau-né est causée par l'incapacité du lit vasculaire pulmonaire à diminuer la RVP tel qu'attendu après la naissance. En effet, durant la vie intra-utérine, il y a une vasoconstriction des vaisseaux pulmonaires, et l'oxygénation du sang se fait via le placenta. Seule une petite partie du sang éjecté du ventricule droit passe alors par la circulation pulmonaire, la majorité rejoignant directement l'aorte par le canal artériel<sup>95</sup>. À la naissance, le nouveau-né peut respirer et la circulation pulmonaire se dilate pour permettre aux poumons de prendre le relais. Dans le cas de l'HTP persistante du nouveau-né, le lit vasculaire pulmonaire garde sa vasoconstriction ce qui maintient le canal pulmonaire et la communication entre les oreillettes ouverte. Le traitement consiste à ventiler le nouveau-né afin de provoquer la vasodilatation du lit pulmonaire par l'apport de dioxygène et la distension des alvéoles pulmonaire. On peut également induire la vasodilatation par inhalation d'oxyde nitrique. Si l'HTP devient trop sévère, l'oxygénation par membrane extracorporelle peut être considérée<sup>95,96</sup>.

L'HTP persistante du nouveau-né peut être la conséquence de plusieurs conditions, entre autres d'une anoxie intra-partum, d'un syndrome d'inhalation du méconium, d'une pneumonie ou bien d'une cardiopathie congénitale. Certains facteurs de risques ont également été identifiés chez la mère tels que le diabète, l'asthme et l'obésité<sup>95,96</sup>.

## 1.3 Présentation anatomopathologique de l'HTAP

L'HTAP se développe à mesure que les résistances augmentent dans lit artériel pulmonaire. Ceci est dû à une vasoconstriction anormale des artères, couplé au remodelage aberrant des petites artéioles de diamètre inférieur à 500  $\mu\text{m}$ . Ce remodelage touche chacune des 3 couches composant les artères pulmonaires : l'adventice, la média et l'intima. Des lésions dites « complexes » sont observées (lésions plexiformes, d'artérites et de dilatations), ainsi que des lésions thrombotiques. L'ensemble des anomalies vasculaires observées en HTAP sont illustrés ci-dessous (Figure 14) :



**Figure 14 : Lésions anatomopathologiques rencontrées en HTAP<sup>97</sup>.**

*A : vasoconstriction ; B : remodelage artériel avec, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau, la formation d'une néo-intima et l'hypertrophie de la média et de l'adventice; C : lésion plexiforme ; D : lésion thrombotique recanalisée.*

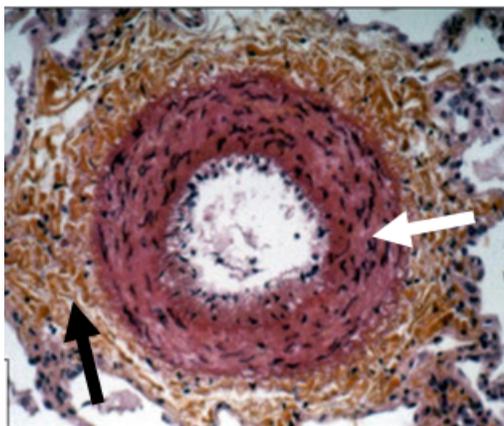
### 1.3.1 Hypertrophie de l'adventice

L'adventice se compose principalement de fibroblastes, mais également de cellules endothéliales issues des *vasa vasora*, de cellules nerveuses adrénergiques, de cellules immunomodulatrices et de cellules progénitrices<sup>98</sup>. Elle joue un rôle dans la régulation du tonus vasculaire, mais également dans la réponse aux dommages vasculaires. En cas de lésions, les fibroblastes adventitiels prolifèrent et se différencient en myofibroblastes. Ils peuvent réguler la réponse immunitaire *via* la production de cytokines, de chimiokines et de molécules d'adhésion permettant le recrutement de cellules inflammatoires (cellules dendritiques, lymphocytes

et macrophages). Par la production de matrice extracellulaire, de métalloprotéases et d'inhibiteurs de métalloprotéases, ils participent également au remodelage et à la migration de cellules au sein du tissu adventiciel. Dans le cas de l'HTAP, l'adventice est épaissie et fibrosée, ce qui contribue à la rigidification du vaisseau (Figure 14B, Figure 15). Les modèles animaux laissent penser que le remodelage et l'accumulation de cellules inflammatoires adventitiels se produisent dans les premiers temps du remodelage vasculaire<sup>99</sup>. L'épaississement de la tunique adventitielle et l'entretien d'une inflammation locale pourraient ainsi favoriser le remodelage des couches médiales et intimes<sup>98,100</sup>.

### 1.3.2 Hypertrophie de la média

La tunique médiale des artères pulmonaires est principalement constituée de cellules musculaires lisses régulant la vasoconstriction. En HTAP, il y a prolifération anormale ainsi qu'une résistance à l'apoptose de ces dernières, ce qui provoque un épaississement de la tunique et contribue progressivement à l'augmentation de la RVP et à l'occlusion artérielle (Figure 14B, Figure 15). Plusieurs facteurs semblent agir conjointement dans l'établissement de ce phénotype comme l'hypoxie, la présence d'un effet Warburg, l'accumulation de dommages à l'ADN et l'activation pathologique de certaines voies de signalisation comme HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$* ), STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*)<sup>101-103</sup>.



**Figure 15 : Hypertrophie de la média et fibrose adventitielle<sup>104</sup>.**

*Fibrose adventitielle (flèche noire); média artérielle (flèche blanche); coloration Weigert-hématoxyline-phloxine-safran, grossissement x200.*

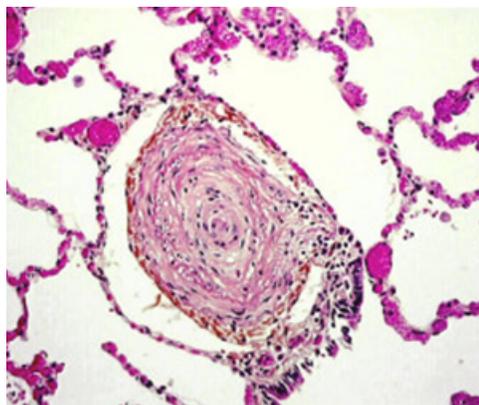
### 1.3.3 Formation d'une néo-intima

L'intima des artères pulmonaires saines est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales. En HTAP, il y a formation d'une néo-intima composée de cellules endothéliales et de cellules exprimant des marqueurs mésenchymateux (Figure 14B). De récents travaux ont mis en évidence qu'il s'agit de cellules ayant quitté la

monocouche endothéliale *via* un processus de transition endothélio-mésenchymateuse<sup>105-108</sup>. Cette migration conduit à une perte de jonction entre les cellules endothéliales et les cellules issues de cette transition qui exhibent un comportement prolifératif. Elles exprimeront un phénotype analogue aux cellules musculaires lisses et aux fibroblastes, et s'accumuleront entre l'endothélium et la média de l'artère. Cela peut s'accompagner d'une production de collagène. Cette néo-intima réduit la lumière de l'artère, participe à l'augmentation des résistances vasculaires et des contraintes de cisaillement, et conduit ultimement à son occlusion<sup>109</sup>. D'un point de vue anatomopathologique, 2 types de lésions intimes peuvent être observées.

#### 1.3.3.1 Lésion laminaire

Les lésions intimes laminaires retrouvées en HTAP sont constituées de couches de cellules mésenchymateuses et de collagène ayant une organisation radiale. La production excessive de collagène conduit à une fibrose intimale. La disposition en strates concentriques de cellules et de fibrose peut prendre une forme en « bulbe d'oignon » (Figure 16). Cette organisation est souvent rencontrée dans les HTAP associées à des connectivites<sup>104,110,111</sup>.

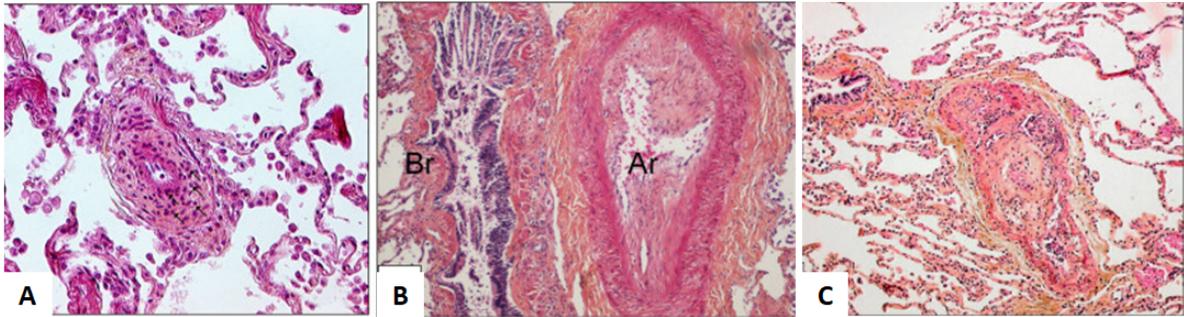


**Figure 16 : Lésion intimale laminaire concentrique<sup>104</sup>.**

*Lésion avec fibrose intimale en « bulbe d'oignon » Grossissement x200. Coloration hématoxyline-éosine-safran.*

#### 1.3.3.2 Lésion non laminaire et thrombotique

Certaines néo-intima ne présentent pas d'architecture en couche, mais une organisation plus uniforme. Leur structure non laminaire peut être concentrique ou excentrique (Figure 17A). Cette organisation peut être le fruit d'un événement thrombotique ou induite par des contraintes de cisaillement (Figure 17B). Dans le cas d'une thrombose, on peut parfois observer une recanalisation des vaisseaux (Figure 14D, Figure 17C)<sup>104,111</sup>.



**Figure 17 : Lésions non laminaires et thrombotiques<sup>104</sup>.**

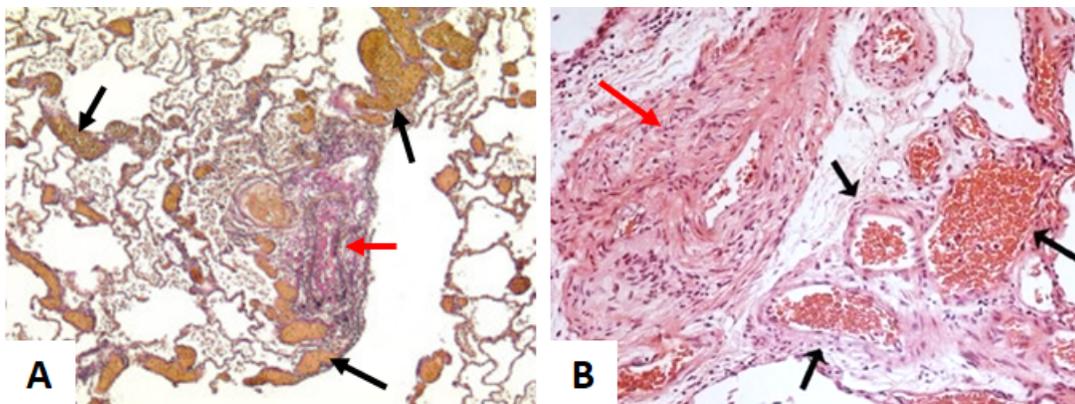
*A : lésion intimale concentrique non laminaire, grossissement x200; B : fibrose intimale organisée dans du matériel thrombotique. Br : bronche, Ar : artère ; C : lésion thrombotique avec re-canalisation, grossissement x100. Coloration hématoxyline-éosine-safran.*

### 1.3.4 Lésions complexes

Les lésions complexes sont plus rares et ne semblent pas jouer un rôle dans la pathologie, mais plus être des marqueurs de sévérité et de progression rapide de l'HTAP<sup>111</sup>. Elles comprennent les lésions de dilatation, plexiformes et d'artérite.

#### 1.3.4.1 Lésions de dilatation

Ces lésions sont dues à un affaiblissement de la paroi artérielle et se situent souvent à proximité d'une lésion plexiforme (Figure 18). La faible épaisseur de la paroi au niveau de la lésion de dilatation lui donne un aspect de veine<sup>111</sup>.



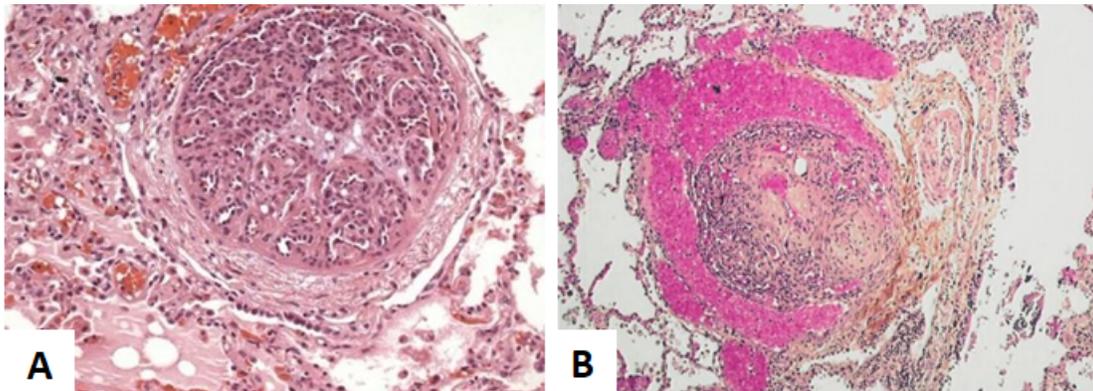
**Figure 18 : Lésions de dilatation observées en l'HTAP<sup>104,112</sup>.**

*Lésions de dilatation (flèches noires) à proximité de lésions plexiformes (flèches rouges). A : coloration Elastica-van-Gieson, grossissement x40; B : coloration hématoxyline-éosine, grossissement x20.*

#### 1.3.4.2 Lésions plexiformes

Les lésions plexiformes se rencontrent au niveau des bifurcations pré- et intra-acinaires dans les zones d'augmentation de débit, en amont d'une obstruction. Ces lésions d'architecture gloméruloïde présentent une multitude de petites lumières vasculaires entourées d'une monocouche de cellules (Figure 14C, Figure 19A). Le reste de la lésion est composée d'amas de cellules endothéliales, de cellules mésenchymateuses issues de transition endothélio-mésenchymateuse, de cellules musculaires lisses, de plaquettes et de dépôts de fibrine. Les lésions plexiformes sont généralement entourées de lésions de dilatation (Figure 19B)<sup>104,105,112-114</sup>.

Une théorie communément mise de l'avant est qu'une agression endothéliale combinée à l'augmentation des contraintes de cisaillement au niveau de la bifurcation favorise localement l'apparition et la prolifération de cellules endothéliales résistantes à l'apoptose<sup>114</sup>. Cela pourrait expliquer l'origine monoclonale des cellules endothéliales observée par Lee *et al.* dans les lésions plexiformes<sup>115</sup>. Cependant, il a été récemment démontré que les lésions plexiformes pourraient être des zones de connexion entre la circulation artérielle et la circulation bronchique<sup>116</sup>. La reconstruction tridimensionnelle des structures à partir de coupes sériées a permis d'identifier des communications allant des lésions plexiformes et des lésions de dilatation aux veines bronchiques. Cela a également mis en relief des zones d'anastomose entre les artères bronchiques et pulmonaires<sup>116</sup>.

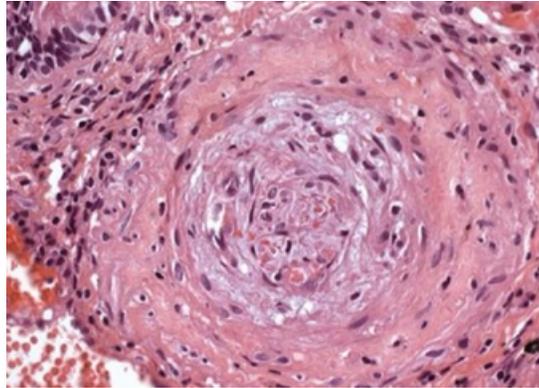


**Figure 19 : Lésions plexiformes**<sup>104,112</sup>.

*A : lésion plexiforme, coloration hématoxyline-éosine, grossissement x20, d'après Aiello VD. et Canzian M. ; B : lésion plexiforme avec fibrose entourée de lésions de dilatation, coloration hématoxyline-éosine-safran, grossissement x100.*

#### 1.3.4.3 Lésions d'artérite

Ces lésions sont très rares chez les patients HTAP. Il s'agit d'une inflammation à la fois chronique et aiguë de la paroi artérielle avec infiltration de lymphocytes T et macrophages et/ou une nécrose fibrinoïde du tissu (Figure 20)<sup>111,117</sup>. Cette lésion est très peu étudiée et semble marginale.



**Figure 20 : Lésion d'artérite<sup>117</sup>.**

*Coloration hématoxyline-éosine, grossissement x40. D'après Aiello VD. et Canzian M.*

## **1.4 Présentation clinique de l'HTAP**

L'HTAP se présente par des symptômes peu spécifiques. Les patients se plaignent le plus souvent d'une dyspnée avec une diminution de la tolérance à l'effort et un état de faiblesse/fatigue générale. Certains patients peuvent présenter également des douleurs thoraciques et des palpitations. Avec la défaillance cardiaque droite qui s'installe, les patients peuvent présenter de l'œdème, de l'ascite, des lipothymies et des syncopes. La cyanose et la toux sont plus rarement vues. La non-spécificité des symptômes conduit à une errance diagnostique d'environ 2 ans et probablement à une sous-estimation du nombre de cas réel. Depuis les 20 dernières années, il n'y aurait pas eu de diminution de ce délai diagnostique. Parfois même, les patients peuvent malheureusement être mal diagnostiqués (ex : diagnostic d'asthme ou de maladie pulmonaire obstructive chronique) avant que l'on identifie l'HTP<sup>118-120</sup>.

À l'examen physique, l'auscultation peut révéler un souffle d'insuffisance tricuspидienne ou pulmonaire, une accentuation de la composante pulmonaire du B2 et un B3 droit. À un stade avancé, l'examen physique peut mettre en lumière une turgescence jugulaire, de l'œdème des membres inférieurs, de l'ascite et une hépatomégalie<sup>121</sup>. On peut également trouver des stigmates de connectivites ou d'hépatopathie s'il y a lieu.

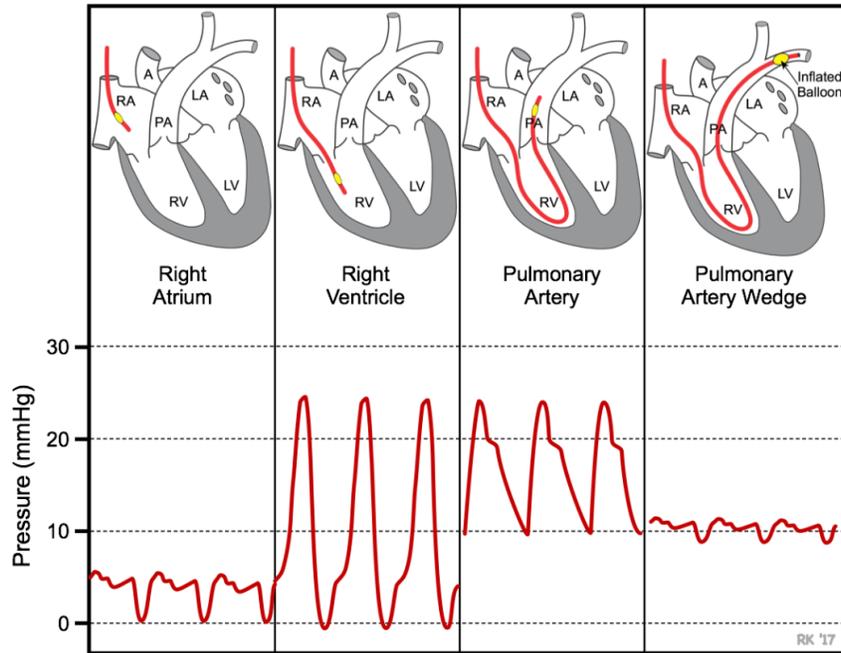
### **1.4.1 Diagnostic de L'HTAP**

Certaines techniques non invasives peuvent permettre de suspecter la présence d'une HTAP. L'évaluation échocardiographique morphologique et fonctionnelle du cœur droit (index de performance myocardique (index de Tei), TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion), analyse de déformation segmentaire (strain), etc.) peut également servir à la détermination du pronostic. Celle-ci révélera entre autres l'augmentation de la pression systolique ventriculaire droite, une dilatation des cavités cardiaques droites au profit du ventricule gauche, une insuffisance tricuspидienne et une dysfonction ventriculaire droite. L'échocardiographie peut également permettre de déceler certaines causes d'HTP telles que les dysfonctions ventriculaires gauches, des

malformations cardiaques, ou encore des valvulopathies. Des épanchements péricardiques peuvent également être observés et témoignent d'une maladie avancée à mauvais pronostic<sup>120,121</sup>. Également, au test de fonction pulmonaire, une diminution isolée de la capacité de diffusion sans autres anomalies peut laisser suspecter une HTP.

Des techniques d'imagerie thoracique peuvent également être réalisées. Une prééminence des vaisseaux au niveau des hiles pulmonaires, la perte de vascularisation pulmonaire distale et une cardiomégalie peuvent ainsi être observés par simple radiographie thoracique. L'utilisation de tomодensitométrie haute résolution (HRCT-*High Resolution Computerized Tomography scan*) permet d'identifier une dilatation de l'oreillette et du ventricule droit, et de mesurer les diamètres du tronc et des artères pulmonaires. Elle permet aussi de mettre en lumière la raréfaction des vaisseaux en périphérie du poumon (« vascular pruning ») et les signes laissant suspecter une MVOP/HCP mentionnés plus haut. L'angiographie par tomодensitométrie et, de préférence, la scintigraphie pulmonaire de ventilation/perfusion (V/Q scan), peuvent révéler des déficits perfusionnels et orienter vers le diagnostic d'une HTP thrombo-embolique<sup>120,122</sup>.

Le diagnostic officiel d'HTAP ne peut être fait que par cathétérisme cardiaque droit, une méthode invasive permettant la mesure, à l'aide d'un cathéter de Swan-Ganz, des pressions dans l'oreillette et le ventricule droit, des PAP ainsi que de la PAPO. Cette dernière est mesurée en gonflant un ballonnet qui obstruera une petite artère (Figure 21). La pression résiduelle en aval du ballonnet reflète la pression au sein des capillaires pulmonaires et estime la pression télédiastolique du ventricule gauche. Le positionnement du cathéter dans le lit artériel pulmonaire permet également de mesurer le débit cardiaque par la méthode de thermodilution. Celle-ci consiste à injecter du liquide à une température connue en amont du ventricule droit *via* la lumière proximale du cathéter et à mesurer la température dans l'artère pulmonaire grâce à un thermocouple situé à son extrémité. La variation de la température en fonction du temps permet de mesurer de façon indirecte le débit cardiaque droit<sup>118</sup>. L'index cardiaque est calculé en divisant le débit cardiaque par la surface corporelle. La RVP peut ensuite être calculée. L'usage du cathéter permet enfin de faire un test de vasoréactivité pulmonaire afin de déterminer les patients répondants aux traitements par inhibiteur calcique<sup>123</sup>.



**Figure 21 : Courbes de pression obtenues au cathétérisme cardiaque droit<sup>124</sup>.**

*Le cathéter Swan-Ganz est représenté en rouge, le ballonnet en jaune. RA : oreillette droite; RV : ventricule droit; PA : artère pulmonaire; LA : oreillette gauche; LV : ventricule gauche; A : aorte. D'après Klabunde RE<sup>124</sup>.*

L'HTAP est définie par une augmentation de la PAPm au repos supérieure à 20 mmHg avec une PAPO inférieure à 15 mmHg et une RVP au-dessus de 3 WU<sup>48</sup>. La mesure de la PAPO permet de différencier l'hypertension pulmonaire pré- et post-capillaire. Une PAPO supérieure à 15 mmHg serait en effet le signe d'une HTP due à une dysfonction cardiaque gauche (HTP postcapillaire isolée [PAPO > 15 mmHg; RVP < 3 WU] ou pré- et postcapillaire combinée [PAPO > 15 mmHg; RVP ≥ 3 mmHg])<sup>48</sup>. Le seuil de PAPm permettant le diagnostic d'une HTP a longtemps été fixé de façon arbitraire à 25 mmHg. Cependant, la mesure de la PAPm au repos chez des sujets sains a montré que celle-ci est normalement de 14.0±3.3 mmHg ce qui indique qu'une PAPm supérieure à 20 mmHg est déjà un signe pathologique<sup>48,125</sup>. La même observation a été faite pour la RVP, fixée arbitrairement à 3 WU pour le diagnostic de l'HTAP, mais qui peut être considérée comme pathologique au-delà de 2 WU<sup>125</sup>. Ce dernier seuil est encore en discussion<sup>126</sup>.

Le diagnostic de l'HTAP nécessite ensuite différentes investigations complémentaires afin de déterminer le type d'HTAP et sa sévérité. En effet, le traitement et le pronostic varient en fonction de la pathologie à l'origine de l'HTAP. Les algorithmes ci-dessous résument l'investigation recommandée (Figure 22 et Figure 23)<sup>119</sup>.

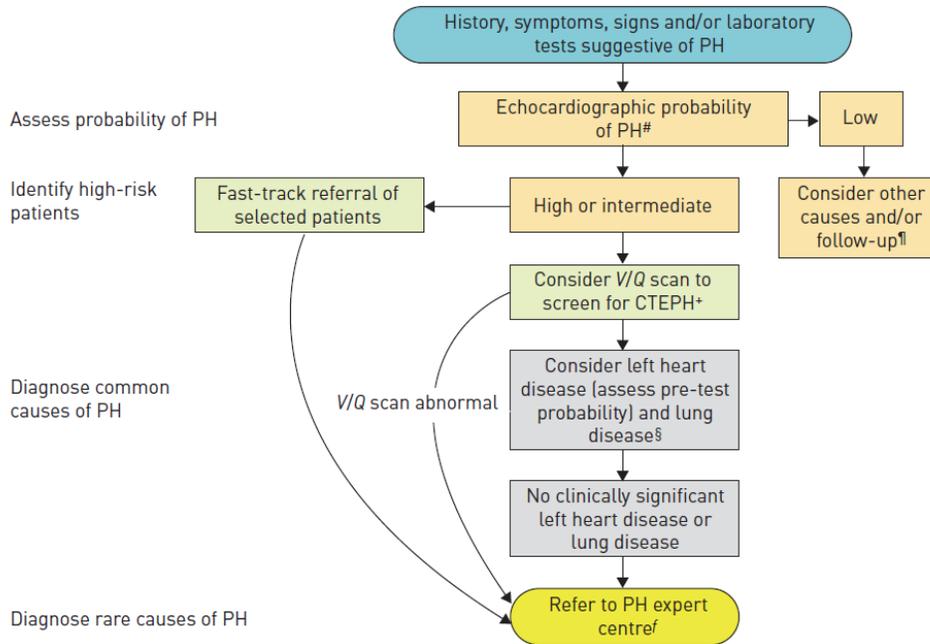


Figure 22 : Algorithme diagnostique des HTPs<sup>119</sup>.

CTEPH : hypertension pulmonaire thromboembolique chronique; PH : hypertension pulmonaire; V/Q scan : scintigraphie pulmonaire de ventilation et perfusion.

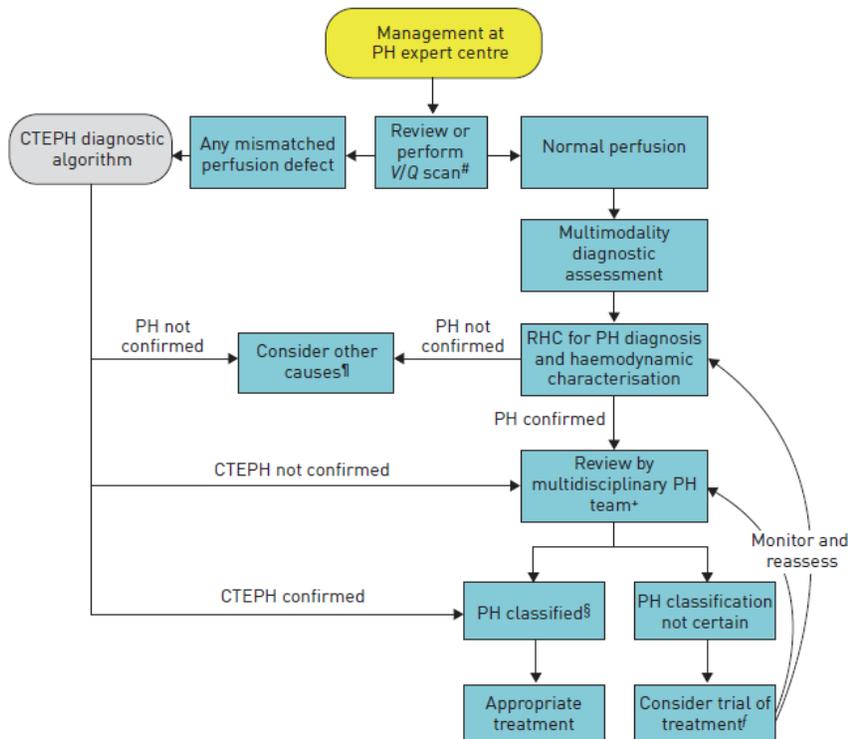


Figure 23 : Algorithme diagnostique des HTPs<sup>119</sup>.

CTEPH : hypertension pulmonaire thromboembolique chronique; PH : hypertension pulmonaire.

## 1.4.2 Suivi de l'HTAP

L'évaluation de la sévérité de l'HTAP se fait en fonction de plusieurs paramètres : symptômes, état fonctionnel, tolérance à l'effort, imagerie et différents marqueurs sériques et hémodynamiques<sup>127</sup>.

### 1.4.2.1 Test de marche

Le test de marche de 6 minutes est un outil permettant d'évaluer fidèlement, simplement et à faible coût la tolérance à l'effort des patients souffrant d'HTP. C'est un critère permettant de mesurer la sévérité et le pronostic de la maladie<sup>128-130</sup>. Il consiste à faire marcher le patient sur la plus grande distance possible durant 6 minutes. Le périmètre parcouru corrèle avec le pic de consommation d'oxygène ( $Vo_2$ ) et la pente ventilation minute/volume de dioxyde de carbone expiré ( $VE/VCO_2$ ) des patients en défaillance cardiaque<sup>131-133</sup>. Le test est influencé par différents facteurs comme l'âge, le sexe, la taille, le poids, le besoin en dioxygène, la compréhension, la motivation et les comorbidités du patient<sup>127</sup>. Ce test peut être complété par un test d'exercice cardiopulmonaire (*Cardiopulmonary exercise testing* [CPET]) qui mesure de façon non invasive la réponse physiologique à l'exercice physique avec effort maximal.

### 1.4.2.2 Classes fonctionnelles

La sévérité clinique de l'HTP est évaluée selon la classification fonctionnelle établie par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (*World Health Organization Functionnal Class – WHO-FC*). Bien que susceptible de varier en fonction de l'observateur, cette classification est un bon outil pour prédire la survie au diagnostic et durant le suivi du patient. Un changement de classe est un bon indicateur de la progression de la pathologie. Cela permet entre autres d'adapter la prise en charge et d'initier les investigations nécessaires à l'identification des causes de détérioration<sup>127</sup>.

**Tableau 2 : Classification fonctionnelle des patients souffrants d'HTP (WHO-FC).**

Classes (WHO-FC)	Classification fonctionnelle de l'OMS
I	Patient avec HTP mais sans limitation dans son activité physique. Son activité physique ordinaire ne cause pas de fatigue excessive, de dyspnée, de douleur thoracique, ni de syncope.
II	Patient avec HTP induisant de légères limitations dans l'activité physique. Le patient est confortable au repos. Une activité physique ordinaire provoque une fatigue excessive ou une dyspnée, des douleurs thoraciques ou des syncopes.
III	Patient avec une HTP induisant une importante limitation dans l'activité physique. Le patient est confortable au repos. Une activité physique limitée provoque une fatigue excessive ou une dyspnée, des douleurs thoraciques ou des syncopes.
IV	Patient avec une HTP l'empêchant d'effectuer n'importe quelle activité physique sans provoquer l'apparition de symptômes. La fatigue et/ou la dyspnée peuvent apparaître même au repos. L'inconfort est augmenté par l'activité physique.

### 1.4.2.3 Paramètres hémodynamiques

Certains paramètres hémodynamiques acquis lors du cathétérisme cardiaque droit ont également une valeur pronostique. Ceux-ci sont la pression dans l'oreillette droite, l'index cardiaque et la saturation veineuse en O<sub>2</sub> (SVO<sub>2</sub>). La SVO<sub>2</sub> est mesurée sur le sang prélevé au niveau de l'oreillette droite. Elle représente la fraction de dioxygène fixée à l'hémoglobine restante après le passage du sang en périphérie. Donc, elle reflète à la fois le transport et la consommation d'O<sub>2</sub> par les tissus. Elle varie en fonction du débit cardiaque, de la perfusion tissulaire, de la demande métabolique, de la saturation artérielle en O<sub>2</sub>, du taux d'hémoglobine et de la capacité de dissociation de celle-ci.

### 1.4.2.4 Biomarqueurs

Différents biomarqueurs se retrouvent augmentés au niveau sanguin. Les niveaux de BNP ou encore de NT-proBNP (*brain natriuretic peptide*) sont les seuls utilisés couramment en clinique et en recherche. Ils corréleront avec la dysfonction myocardique et ont une valeur pronostique<sup>134</sup>. Quelques exemples d'autres marqueurs retrouvés en HTAP sont les biomarqueurs de la dysfonction endothéliale comme l'ADMA (*asymmetric dimethylarginine*), le facteur de von Willebrand ou l'endothéline-1, les marqueurs inflammatoires (protéine C-réactive, IL-1-β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 et TNF-α) et les marqueurs d'hypoxie (acide urique, ostéopontine, etc.)<sup>127,134-136</sup>. Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique à l'HTAP et ils ne sont généralement pas accessibles en clinique.

## 1.5 Thérapies actuelles

### 1.5.1 Prise en charge non spécifique

La prise en charge non pharmacologique est essentielle pour les patients souffrant d'HTAP. Elle comprend une réadaptation physique supervisée afin de permettre aux patients d'améliorer leur tolérance à l'effort, leur fonction musculaire et leur qualité de vie. Les patients devraient tenter de rester actifs et autonomes dans les limites de leurs symptômes<sup>137</sup>. Les patientes devraient éviter les grossesses et être conseillées sur les traitements contraceptifs. Les patients atteints d'HTAP doivent également éviter les chirurgies sous anesthésie générale le plus possible. Les patients de classe fonctionnelle III et IV sont des patients chez qui la supplémentation en oxygène devrait être considérée en avion. Les patients avec une PaO<sub>2</sub> inférieure à 60 mmHg bénéficient de l'oxygénothérapie à long terme. La vaccination contre le pneumocoque et l'influenza est recommandée pour tous les patients. Un traitement anticoagulant peut être considéré chez les patients avec HTAPi, HTAPh et l'HTAP secondaire à la prise d'anorexigène. Les diurétiques sont recommandés chez les patients avec symptômes d'insuffisance cardiaque. Jusqu'à 43% des patients avec l'HTAP souffrent d'anémie et une supplémentation en fer peut être donnée afin d'améliorer leur capacité à l'effort. L'HTAP s'accompagnant de

lourds symptômes, un soutien psychologique et émotionnel est recommandé de façon proactive. Enfin, il est important d'éduquer le patient et ses proches afin d'établir un partenariat médecin-patient et d'optimiser l'adhérence au traitement<sup>127</sup>.

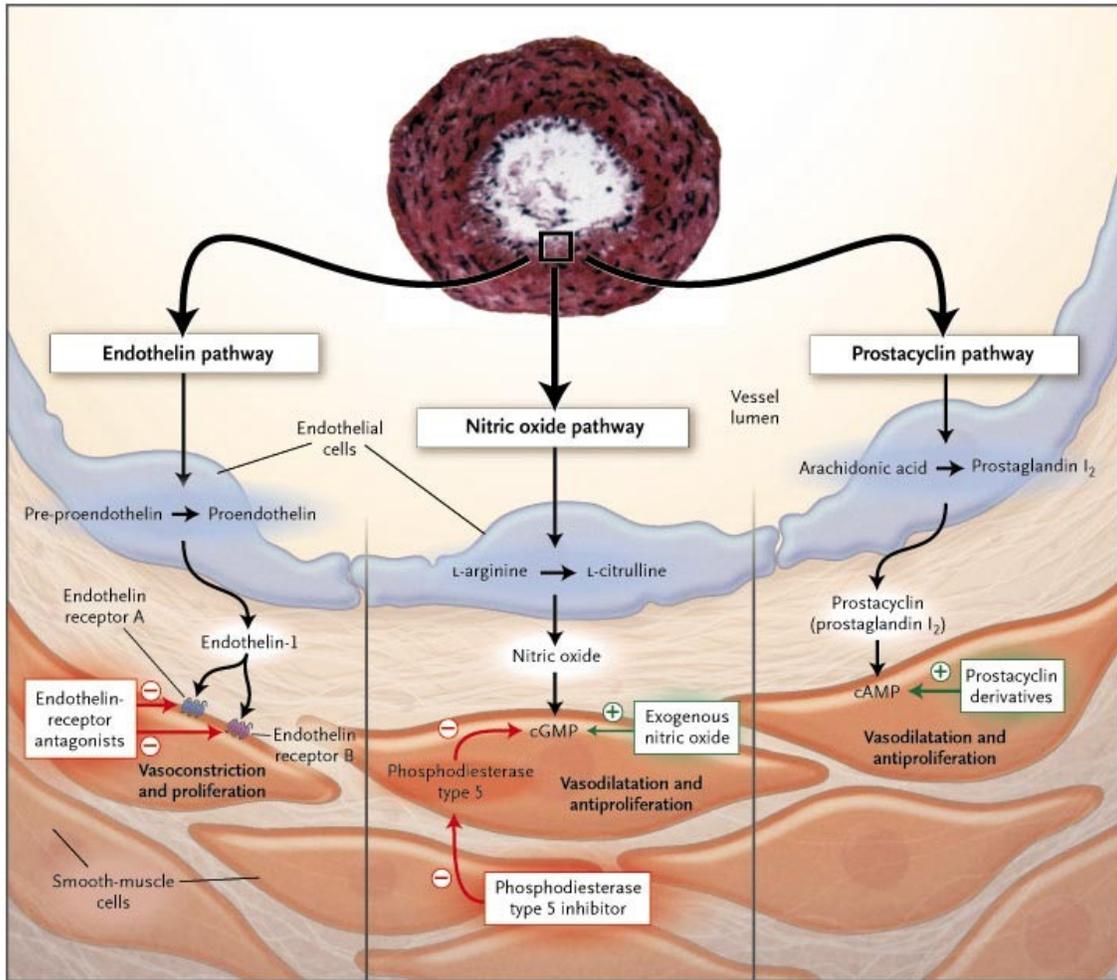
### 1.5.2 Thérapies spécifiques

Les thérapies spécifiques actuelles de l'HTAP sont des traitements vasodilatateurs. L'objectif de cette pharmacopée est de ramener et maintenir les patients en un profil de risque faible décrit dans le tableau ci-dessous (Tableau 3)<sup>127</sup>. Le traitement peut être effectué en monothérapie ou en combinaison, selon la sévérité des symptômes et du statut de « répondeur » aux bloqueurs calciques du patient. Pour les patients « non-répondeurs », ce sont 3 voies de signalisation qui sont ciblées : la voie de l'endothéline, la voie du monoxyde d'azote *via* la phosphodiesterase 5 et enfin la voie de la prostacycline (Figure 24)<sup>138</sup>.

**Tableau 3 : Évaluation pronostique en HTAP<sup>127</sup>.**

*BNP : Brain natriuretic peptide; IRM : imagerie par résonance magnétique; NT-proBNP : N-terminal pro-brain natriuretic peptide; VE/VCO<sub>2</sub> : rapport entre la ventilation minute et le volume de dioxyde de carbone produit; Pic VO<sub>2</sub> : volume de dioxygène maximal consommé; SVO<sub>2</sub> : saturation veineuse en dioxygène.*

Facteurs pronostiques (taux de mortalité estimé à 1 an)	Risque faible <5%	Risque intermédiaire 5-10%	Risque élevé >10%
Signes cliniques de défaillance cardiaque droite	Absent	Absent	Présent
Progression des symptômes	Non	Lente	Rapide
Syncopes	Non	Occasionnelle	Répétées
Classe fonctionnelle de l'OMS	I, II	III	IV
Test de marche de 6 minutes	>440 m	165-440 m	<165 m
Test d'exercice cardiopulmonaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pic VO<sub>2</sub> &gt;15 mL/min/kg (&gt;65% prédiction)</li> <li>▪ VE/VCO<sub>2</sub> &lt;36</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pic VO<sub>2</sub> 11-15 mL/min/kg (35-65% prédiction)</li> <li>▪ VE/VCO<sub>2</sub> 36-44,9</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pic VO<sub>2</sub> &lt;11 mL/min/kg (&lt;35% prédiction)</li> <li>▪ VE/VCO<sub>2</sub> ≥45</li> </ul>
Taux plasmatiques de BNP ou NT-proBNP	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BNP &lt;50 ng/L</li> <li>▪ NT-proBNP &lt;300 ng/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BNP 50-300 ng/L</li> <li>▪ NT-proBNP 300-1400 ng/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ BNP &gt;300 ng/L</li> <li>▪ NT-proBNP &gt;1400 ng/L</li> </ul>
Imagerie (échocardiographie, IRM cardiaque)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Surface de l'oreillette droite &lt;18 cm<sup>2</sup></li> <li>▪ Pas d'épanchement péricardique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Surface de l'oreillette droite 18-26 cm<sup>2</sup></li> <li>▪ Épanchement péricardique absent ou minime</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Surface de l'oreillette droite &gt;26 cm<sup>2</sup></li> <li>▪ Épanchement péricardique</li> </ul>
Paramètres hémodynamiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pression dans l'oreillette droite &lt;8 mmHg</li> <li>▪ Index cardiaque ≥2,5 L/min/m<sup>2</sup></li> <li>▪ SVO<sub>2</sub> &gt; 65%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pression dans l'oreillette droite 8-14 mmHg</li> <li>▪ Index cardiaque 2,0-2,4 L/min/m<sup>2</sup></li> <li>▪ SVO<sub>2</sub> 60-65%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pression dans l'oreillette droite &gt;14 mmHg</li> <li>▪ Index cardiaque &lt;2,0 L/min/m<sup>2</sup></li> <li>▪ SVO<sub>2</sub> &lt; 60%</li> </ul>



**Figure 24 : Voies de signalisation utilisées dans le traitement des patients atteints d'HTAP "non-répondeurs"<sup>138</sup>.**

*Les voies de signalisation de l'endothéline, du monoxyde d'azote et de la prostacycline sont impliquées dans la vasoconstriction ainsi que dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires. La modulation pharmacologique de ces voies est utilisée dans le traitement des patients souffrant d'HTAP.*

Chaque molécule ou intervention thérapeutique sont classées selon leur grade de recommandation jugeant de leur utilité, efficacité et de leur effet bénéfique ou délétère (Tableau 4). À ces grades de recommandation s'ajoutent également 3 niveaux de preuves reflétant la solidité de ceux-ci (Tableau 5). Cette notation permet de distinguer les recommandations obtenues par des études cliniques randomisées, ou sur la base d'un consensus d'experts appuyé par de petites études, des études rétrospectives ou des analyses de registres<sup>127</sup>. Un algorithme de prise en charge thérapeutique a été suggéré par l'European Cardiology Society (ECS) et l'European Respiratory Society (ERS) en 2015 (Figure 25)<sup>139</sup>

**Tableau 4 : Classes de recommandation des traitements.**

<b>Classes de recommandation</b>	<b>Définition</b>	<b>Terminologie recommandée</b>
<b>Classe I</b>	Preuve et/ou consensus indiquant que le traitement ou la procédure est bénéfique, utile et efficace.	Recommandé/indiqué
<b>Classe II</b>	Preuves contradictoires et/ou absence de consensus au sujet de l'utilité/efficacité d'un traitement ou d'une procédure.	
<b>Classe IIa</b>	<i>Le poids de la preuve/l'opinion générale est en faveur de l'utilité/l'efficacité.</i>	Devrait être considéré
<b>Classe IIb</b>	<i>L'utilité/l'efficacité est moins bien établie par les preuves/l'opinion générale.</i>	Peut-être considéré
<b>Classe III</b>	Les preuves ou le consensus concluent à l'inutilité/l'inefficacité, voir dans certains cas à la dangerosité du traitement ou d'une procédure.	N'est pas recommandé

**Tableau 5 : Niveaux de preuve des recommandations.**

<b>Niveau de preuve A</b>	Informations obtenues par des études cliniques randomisées ou des méta-analyses
<b>Niveau de preuve B</b>	Informations obtenues par une seule étude clinique randomisée ou de larges études cliniques non randomisées
<b>Niveau de preuve C</b>	Consensus d'opinion d'experts et /ou de petites études, d'études rétrospectives ou de registres.

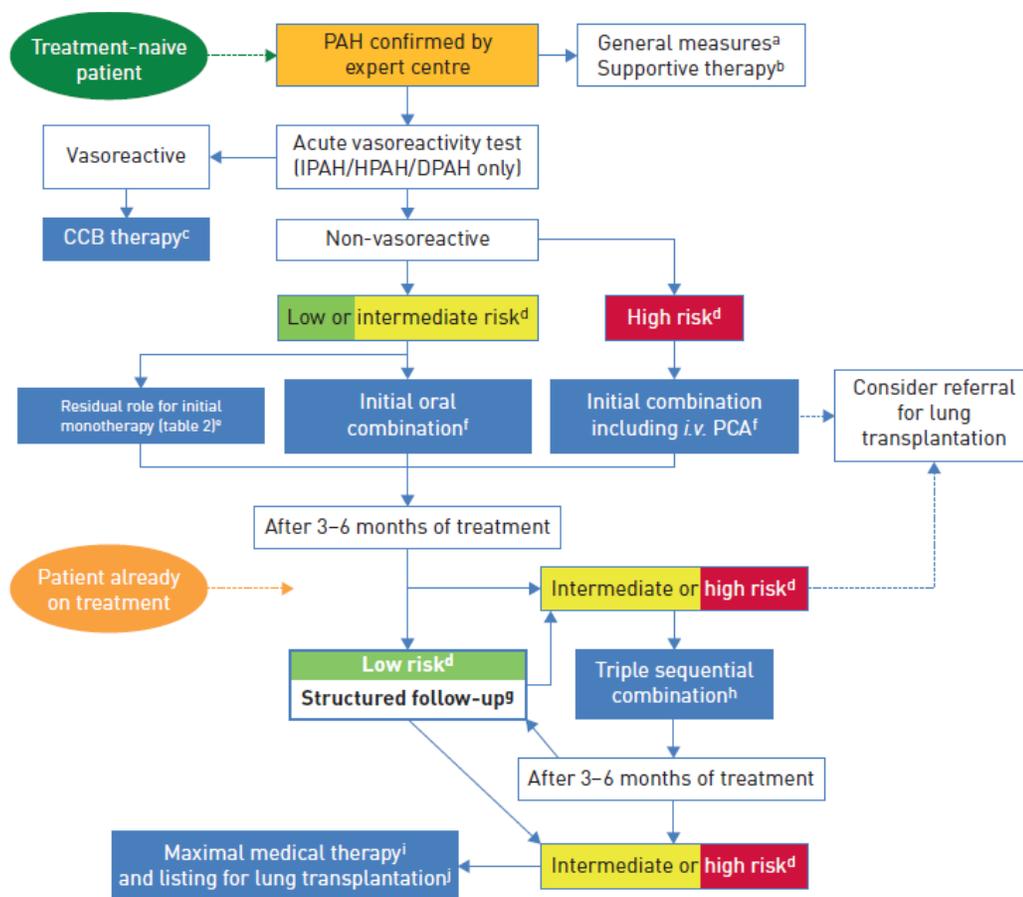


Figure 25 : Algorithme de traitement de l'HTAP<sup>139</sup>

PAH : hypertension artérielle pulmonaire; IPAH : HTAP idiopathique; HPAH : HTAP héréditaire; DPAH : HTAP induite par des drogues et substances toxiques; CCB : bloqueur des canaux calciques; PCA : analogue de la prostacycline. <sup>a</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 16; <sup>b</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 17; <sup>c</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 18; <sup>d</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 13; <sup>e</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 19; <sup>f</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 20; <sup>g</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 14; <sup>h</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 21; <sup>i</sup>: une thérapie médicale maximale est considérée comme une trithérapie incluant un PCA en administration sous-cutanée ou intraveineuse; <sup>j</sup>: 2015 ESC/ERS PH guidelines Tableau 22.

### 1.5.2.1 Inhibiteurs des canaux calciques

Les bloqueurs des canaux calciques sont proposés aux patients identifiés comme « répondeurs » lors du test de vasoréactivité effectué durant le cathétérisme cardiaque droit. Chez ces derniers, ce traitement améliore grandement la qualité de vie en abaissant les RVP et est un facteur de bon pronostic. Trois molécules sont utilisées pour le traitement des patients HTAP : nifédipine, amlodipine et diltiazem. Le choix repose essentiellement sur la fréquence cardiaque des patients, le diltiazem étant le seul bloqueur calcique nondihydropyridique, ayant de ce fait un effet chronotrope négatif. Ces thérapies sont très bien tolérées à long terme. Cependant, la majorité des patients finissent par ne plus répondre et nécessitent d'autres molécules<sup>127,140,141</sup>.

### 1.5.2.2 Antagonistes des récepteurs de l'endothéline

L'endothéline-1 est sécrétée principalement par les cellules endothéliales et, dans une moindre mesure, par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes vasculaires pulmonaires sous l'effet de l'hypoxie. Ce neuropeptide se fixe sur les récepteurs ET<sub>B</sub> au niveau des cellules endothéliales et ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> au niveau des cellules musculaires. Les antagonistes des récepteurs de l'endothéline, en fonction de leur affinité pour ces récepteurs, et possiblement de la proportion de ceux-ci, auront un effet vasodilatateur (*via* une augmentation de la production de monoxyde d'azote et de prostacycline, et l'élimination de l'endothéline circulante), ou encore un effet vasoconstricteur<sup>142</sup>. L'endothéline-1 est augmentée dans le plasma des patients HTAP et semble jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HTAP<sup>143</sup>. Trois antagonistes des récepteurs à l'endothéline ayant démontré un effet vasodilatateur sont disponibles pour le traitement des patients HTAP : l'ambrisentan, le bosentan et le macitentan.

L'ambrisentan est un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub>. Son utilisation permet d'améliorer grandement la capacité à l'effort et les paramètres hémodynamiques des patients HTAPi, ainsi que le temps avant la détérioration clinique. Néanmoins, il peut causer de la dysfonction hépatique et des œdèmes périphériques<sup>127,144</sup>.

Le bosentan est un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Son efficacité fut démontrée au cours de 6 essais cliniques randomisés. Bien que le bosentan améliore grandement la tolérance à l'effort, les paramètres hémodynamiques et retarde le temps avant la détérioration clinique, il est aussi connu pour provoquer des atteintes hépatiques chez 10% des patients<sup>127,145</sup>.

Le macitentan est un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ayant une efficacité et une stabilité métabolique supérieures au bosentan et est destiné à remplacer ce dernier<sup>146,147</sup>. Son utilisation améliore grandement les paramètres de l'HTAP, même chez les patients étant précédemment traités au bosentan. De plus, il ne semble pas présenter de toxicité hépatique<sup>127,148-150</sup>.

### 1.5.2.3 Inhibiteurs de la phosphodiesterase 5

L'effet vasodilatateur du monoxyde d'azote passe par l'activation de la guanylate cyclase. Cette dernière, une fois activée par le monoxyde d'azote, catalyse la synthèse de guanosine monophosphate cyclique qui provoque le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires, inhibe leur prolifération ainsi que l'agrégation des thrombocytes. La phosphodiesterase 5 compense cet effet en inhibant et dégradant la guanosine monophosphate cyclique, ce qui favorise donc la vasoconstriction. L'utilisation d'inhibiteurs de phosphodiesterase 5 permet donc de favoriser l'effet vasodilatateur du monoxyde d'azote<sup>127,140</sup>. Trois molécules sont utilisées: le sildénafil, le tadalafil, et le vardenafil. Celles-ci permettent d'améliorer les paramètres hémodynamiques des patients ainsi que leur périmètre de marche et le temps avant la détérioration clinique.

Cependant, l'effet vasodilatateur s'accompagne d'effets secondaires modérés comme des migraines, du flushing, des vomissements et des épistaxis pour ne mentionner que ceux-ci<sup>127,140,151</sup>.

#### 1.5.2.4 *Stimulateur de la guanylate cyclase*

La voie de signalisation de vasodilatation via le monoxyde d'azote décrite plus haut peut aussi être potentialisée par l'utilisation de molécules stimulant la production de guanylate cyclase. L'effet vasodilatateur produit fonctionne même en absence de monoxyde d'azote. Une seule molécule de cette classe est disponible pour le traitement des patients souffrant d'HTAP : le riociguat. Ce médicament permet d'améliorer de façon significative les paramètres hémodynamiques, la capacité à l'effort, le temps avant la détérioration clinique, ainsi que la classe fonctionnelle des patients avec HTAP. Il induit aussi une baisse des marqueurs de défaillance ventriculaire, les NT-proBNP. Le riociguat est globalement bien toléré par les patients. Ses effets secondaires sont des migraines, des étourdissements, des vomissements, de la dyspepsie et des diarrhées. Plus rarement, il peut causer des hémoptysies<sup>152</sup>.

Les stimulateurs de guanylate cyclase agissant sur la même voie de signalisation que les inhibiteurs de de phosphodiesterase 5, leur usage simultané est contre-indiqué. En effet, leur combinaison n'améliore pas les paramètres hémodynamiques des patients et provoque une hypotension importante, allant même jusqu'au décès<sup>153</sup>.

#### 1.5.2.5 *Analogues de la prostacycline*

La prostacycline est un vasodilatateur produit par les cellules endothéliales agissant sur la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. Sa fixation sur les récepteurs au niveau de ces dernières provoque une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique, qui augmente l'activité de la protéine kinase A, qui stimule la vasodilatation. La prostacycline a un effet antiprolifératif sur celles-ci, ainsi qu'un effet anti-inflammatoire et antithrombotique<sup>154-157</sup>. La production de prostacycline et l'expression de ses récepteurs semblent diminuées en HTAP<sup>158,159</sup>. Ses métabolites sont également retrouvés en quantité moindre dans les urines des patients<sup>160</sup>. 5 molécules sont utilisées afin d'activer la voie de la prostacycline : l'epoprostenol, le treprostinil, l'iloprost, le beraprost et le selexipag<sup>127,140</sup>.

L'epoprostenol est de la prostacycline synthétique. Administré en perfusion intraveineuse, il améliore les paramètres hémodynamiques, la tolérance à l'effort, les symptômes et la mortalité des patients souffrant d'HTAP<sup>127,129</sup>. Ses principaux inconvénients sont sa courte demi-vie (inférieure à 5 minutes) et conséquemment, la nécessité d'administration intraveineuse en continu. De plus, l'arrêt impromptu du traitement peut provoquer une importante majoration de l'HTAP et le décès du patient par décompensation cardiaque. Quelques-uns de

ses effets secondaires sont des vomissements, des diarrhées, des douleurs aux jambes et à la mâchoire et des migraines<sup>127,140</sup>.

Le treprostinil est un analogue de la prostacycline avec une stabilité à température ambiante d'environ 72h. Il peut être administré par inhalation, par voie orale ou en injection sous-cutanée ou intraveineuse. Il permet d'améliorer le périmètre de marche, l'hémodynamie et la qualité de vie des patients. Ses effets secondaires sont semblables à ceux de l'époprostenol. Enfin, une douleur au niveau du site d'injection est présente chez 85% des patients et peut causer un arrêt prématuré du traitement<sup>127,140</sup>.

L'iloprost est un analogue de prostacycline inhalé. Ses effets thérapeutiques et secondaires sont similaires à ceux du treprostinil. Utilisé en combinaison avec le bosentan, il améliore les résultats au test de marche de 6 minutes et la classe fonctionnelle des patients avec HTAP par rapport à ceux sous bosentan seul<sup>161</sup>.

Le beraprost est un analogue de la prostacycline administré par voie orale. Il permet une amélioration de la tolérance à l'effort des patients sur une durée de 3 à 6 mois. Ses effets secondaires sont similaires aux molécules de la même classe<sup>127,140</sup>.

Le selexipag est quant à lui un analogue sélectif des récepteurs à la prostacycline en comprimés. Il peut être utilisé en mono- ou bithérapie avec des inhibiteurs de phosphodiesterase 5 et les antagonistes des récepteurs de l'endothéline. Son utilisation améliore la tolérance à l'effort et réduit de l'ordre de 40% le risque de morbidité des patients souffrant d'HTAP<sup>127,140,162</sup>.

#### *1.5.2.6 Combinaisons thérapeutiques*

La pharmacopée actuelle de l'HTAP cible 3 voies de signalisation défaillantes dans l'HTAP : la voie l'endothéline, la voie du monoxyde d'azote et la voie de la prostacycline, en plus de l'inhibition des canaux calciques chez les patients « répondeurs ». L'utilisation de traitements ciblant simultanément plusieurs de ces cibles thérapeutiques permet d'obtenir de meilleurs résultats en comparaison avec les monothérapies, sans augmenter les effets secondaires graves. Les bénéfices du traitement combiné sont une amélioration des paramètres hémodynamiques, de la tolérance à l'effort et la réduction du risque de détérioration clinique<sup>163</sup>. Les combinaisons recommandées peuvent varier en fonction de la classe fonctionnelle des patients et selon si elles sont données en combinaison d'emblée ou de façon séquentielle (Tableau 6, Tableau 7).

Malgré les récents progrès dans la prise en charge thérapeutique pour retarder la progression de la pathologie et améliorer la qualité de vie des patients, les thérapies actuelles ne guérissent pas la maladie. La greffe pulmonaire, ou même cardio-pulmonaire ne peut être envisagée que chez certains patients. L'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP est donc primordiale pour identifier de nouvelles cibles

thérapeutiques. De plus, la mise au point de nouvelles méthodes de suivi non invasives est nécessaire afin de faciliter la prise en charge et le suivi de la maladie et d'améliorer notre évaluation pronostique.

**Tableau 6 : Recommandations des thérapies combinées initiales de l'HTAP<sup>127</sup>.**

Tableau des recommandations des thérapies combinées initiales indiquant la classe de recommandation de celle-ci (voir Tableau 4) ainsi que son niveau de preuve (Tableau 5) pour chaque classe fonctionnelle (WHO-FC) (Tableau 2). ARE: antagonistes des récepteurs de l'endothéline; iPDE5 : inhibiteurs des phosphodiesterase 5; i. v. : intraveineuse; s. c. : injection sous-cutanée; WHO-FC : classe fonctionnelle (World Health Organization-functional class).

Traitements	Classe de recommandation - niveau de preuve					
	WHO-FC II		WHO-FC III		WHO-FC IV	
	Classe	Niveau	Classe	Niveau	Classe	Niveau
Ambrisentan + tadalafil	I	B	I	B	IIb	C
Autre ARE + iPDE5	IIa	C	IIa	C	IIb	C
Bosentan + sildenafil + epoprostenol i.v.	-	-	IIa	C	IIa	C
Bosentan + epoprostenol i.v.	-	-	IIa	C	IIa	C
Autre ARE ou iPDE5 + treprostinil s. c.			IIb	C	IIb	C
Autre ARE ou iPDE5 + analogues de prostacycline i. v.			IIb	C	IIb	C

**Tableau 7: Recommandations pour l'efficacité des combinaisons séquentielles<sup>127</sup>.**

Tableau des recommandations pour l'efficacité des combinaisons séquentielles indiquant la classe de recommandation de celle-ci (voir Tableau 4) ainsi que son niveau de preuve (Tableau 5) pour chaque classe fonctionnelle (WHO-FC) (Tableau 2). ARE: antagonistes des récepteurs de l'endothéline; iPDE5 : inhibiteurs des phosphodiesterase 5; i. v. : intraveineuse; s. c. : injection sous-cutanée.

Mesure/traitement	Classe de recommandation – Niveau de preuve					
	WHO-FC II		WHO-FC III		WHO-FC IV	
	Classe	Niveau	Classe	Niveau	Classe	Niveau
Macitentan ajouté au sildénafil	I	B	I	B	IIa	C
Riociguat ajouté au bosentan	I	B	I	B	IIa	C
Selexipag ajouté à un ARE et/ou iPDE5	I	B	I	B	IIa	C
Sildénafil ajouté à l'epoprostenol	-	-	I	B	IIa	B
Treprostinil inhalé ajouté au sildénafil ou bosentan	IIa	B	IIa	B	IIa	C
Iloprost inhalé ajouté au bosentan	IIb	B	IIb	B	IIb	C
Tadalafil ajouté au bosentan	IIa	C	IIa	C	IIa	C
Ambrisentan ajouté au sildénafil	IIb	C	IIb	C	IIb	C
Bosentan ajouté à l'epoprostenol	-	-	IIb	C	IIb	C
Bosentan ajouté au sildénafil	IIb	C	IIb	C	IIb	C
Sildénafil ajouté au bosentan	IIb	C	IIb	C	IIb	C
Autre double combinaison	IIb	C	IIb	C	IIb	C
Autre triple combinaison	IIb	C	IIb	C	IIb	C
Riociguat ajouté au sildénafil ou autre iPDE5	III	B	III	B	III	B

# Chapitre 2. Calcification vasculaire

## 2.1 Calcification ectopique vasculaire

La calcification vasculaire est un processus de minéralisation secondaire à l'induction d'une ostéochondrogénèse pathologique du lit vasculaire. La calcification vasculaire peut être observée dans les pathologies vasculaires associées au vieillissement, au diabète, à la dyslipidémie, aux désordres du métabolisme du calcium, aux maladies rénales chroniques, etc<sup>164,165</sup>. La présence de cette calcification ectopique est un signe de mauvais pronostic et prédit des complications cardiovasculaires<sup>165</sup>. En effet, elle est associée à une rigidification des vaisseaux, ce qui en diminue la compliance. La biominéralisation ectopique est un phénomène complexe pouvant être initié par un stress inflammatoire ou métabolique (comme une hyperlipidémie ou hyperglycémie) chronique, une destruction de l'élastine ou une prédisposition génétique<sup>166</sup>. La calcification vasculaire peut avoir 2 localisations distinctes : l'intima ou la média des vaisseaux.

### 2.1.1 Calcification intimale

La calcification intimale est le résultat d'une inflammation importante de cette couche du vaisseau. Elle se rencontre chez les patients atteints d'hyperlipidémie, d'un syndrome métabolique ou d'athérosclérose. Chez ces derniers, des dommages répétés aux cellules endothéliales composants l'intima permettent le passage et l'accumulation de cholestérol de faible densité. Ces lipoprotéines forment alors des complexes avec les protéoglycanes présents dans la matrice sous-endothéliale. Cette accumulation de cholestérol de faible densité induit une réponse inflammatoire amenant à une lésion d'athérome. Au cours de celle-ci, les macrophages et les cellules spumeuses mobilisés oxydent le complexe cholestérol-protéoglycanes créant ainsi des lipoprotéines de basses densités oxydées. Ces dernières sont toxiques et peuvent provoquer la mort cellulaire, ce qui favoriserait en retour l'inflammation. Dans ce contexte d'inflammation intense, on observe deux phénomènes de transdifférenciation. Une partie des cellules endothéliales vont quitter l'endothélium et se transformer en cellules mésenchymateuses *via* un processus de transition endothélio-mésenchymateuse et participer à la formation de la plaque d'athérome<sup>167-172</sup>. Ces cellules exprimant des marqueurs de cellules musculaires lisses sont connues pour pouvoir se différencier en pseudo-chondrocytes/ostéoblastes<sup>173,174</sup> et ce type de transdifférenciation a été rapporté *in situ* dans les lésions athérosclérotiques<sup>175</sup>. La seconde forme de transdifférenciation est celle des cellules myéloïdes vers un phénotype ostéogénique<sup>176-178</sup>. Au fur et à mesure que la lésion devient nécrotique, ces mécanismes de transformation de phénotypes vont créer une population de cellules ostéogéniques qui minéraliseront la lésion<sup>166,179-183</sup>. Une des principales complications est la rupture de plaque pouvant causer l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral<sup>172</sup>.

### 2.1.2 Calcification médiale

La calcification médiale (également appelée sclérose de Monckeberg) s'observe dans le cas de diabète, d'hypertension artérielle systémique, de pathologies rénales, d'hyperparathyroïdie ou d'ostéoporose. La calcification médiale n'est pas diffuse et se concentre au niveau des couches élastiques du vaisseau<sup>166,179,180</sup>. Dans le cas du diabète, la présence de radicaux libres induit une inflammation chronique au niveau de l'adventice. L'hyperglycémie et la formation excessive de sous-produits de glycosylation couplées à l'inflammation chronique locale favorisent la prolifération, la transdifférenciation et la migration des myofibroblastes adventitiels vers la média ainsi que l'acquisition par les cellules musculaires médiales d'un phénotype ostéogénique. L'inflammation n'est pas essentielle au processus. En effet, la calcification médiale peut aussi être le résultat d'une perte d'inhibition des voies de signalisation procalcifiantes tel qu'observé dans les maladies rénales chroniques. Ces processus de calcification médiale résultent en un épaissement de la paroi vasculaire et à sa minéralisation<sup>174,182,183</sup>. Les principales conséquences hémodynamiques sont une augmentation de la rigidité vasculaire, de la pression pulsée et de la courbe de vélocité<sup>172</sup>.

## 2.2 Mécanismes moléculaires de la calcification vasculaire

Les deux types de calcifications peuvent apparaître indépendamment l'un de l'autre, suggérant des mécanismes locaux très spécifiques. Cependant, les deux peuvent coexister, notamment dans le cas de l'insuffisance rénale au stade terminal<sup>184</sup>. Dans ce type de pathologie, la concentration anormalement élevée d'ions de calcium et de phosphate va directement stimuler les voies moléculaires de différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires vers un phénotype ostéogénique<sup>182</sup>. Les autres processus moléculaires favorisant la transdifférenciation des cellules vasculaires vers des phénotypes calcifiant sont le stress oxydant, le stress du réticulum endoplasmique, le stress mécanique, la dysfonction mitochondriale, les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN, la perte de facteurs inhibant la calcification, une modification de l'homéostasie calcium/phosphate, ainsi que l'apoptose des cellules musculaires lisses<sup>165,172</sup>. Chacun de ces facteurs favorisent l'activation de voies de signalisations pouvant mener à la reprogrammation des cellules musculaires lisses vers un phénotype pseudo-ostéoblastique au niveau de la média et de l'intima des vaisseaux, tel que résumé ci-après (Figure 26)<sup>165,179</sup>. Parmi les gènes clés dans l'acquisition d'un tel phénotype, il est possible de citer la surexpression *Msx2* (*Msh homeobox 2*), *BMP-2* (*Bone morphogenetic protein 2*), *Sox9* (*sex determining region Y-box 9*), *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*) et *Osx* (*osterix*)<sup>164,165</sup>.

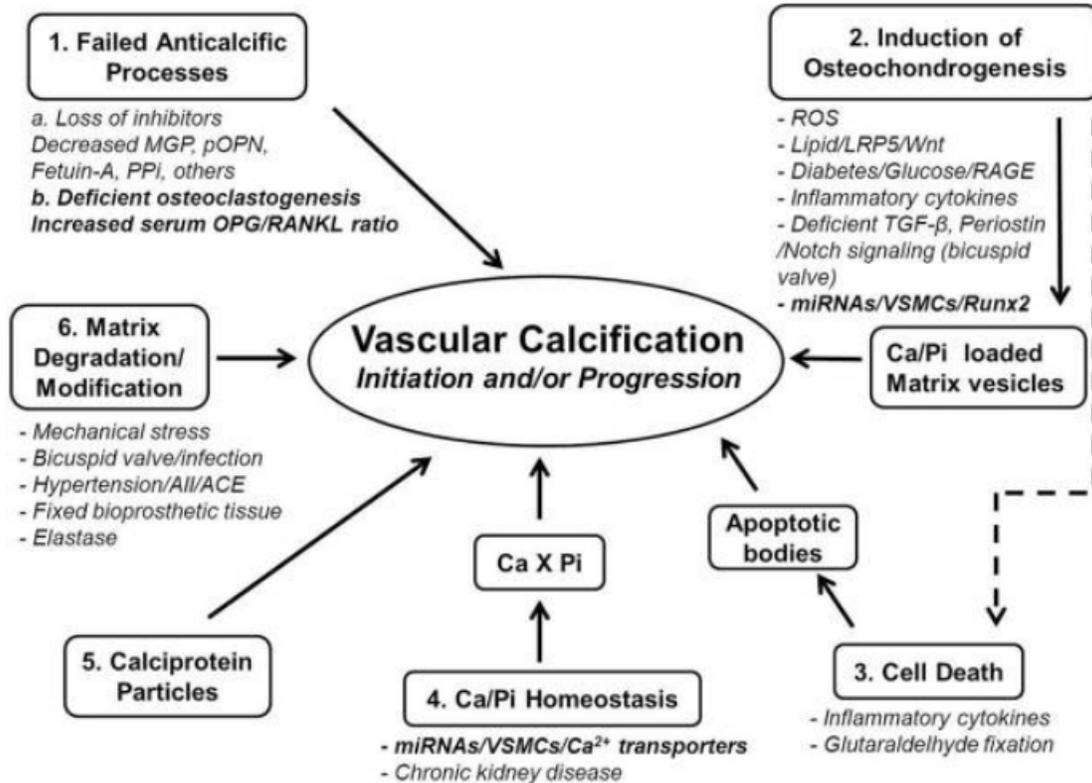


Figure 26 : Principaux mécanismes moléculaires et médiateurs de la calcification vasculaire<sup>179</sup>.

Liste des principaux mécanismes impliqués dans l'initiation ou la progression de la calcification vasculaire. MGP : matrix Gla protein; pOPN : ostéopontine plasmatique; PPI : pyrophosphate; OPG : ostéoprotégerine; RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; VSMCs: cellules musculaires lisses vasculaires; ROS : dérivés réactifs de l'oxygène; LRP5 : protéine 5 du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5); TGF $\beta$  : facteur de croissance transformant  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ); RAGE : récepteur des produits finaux de glycation avancée (receptor for advanced glycation endproducts).

## 2.2.1 Facteurs favorisant l'acquisition du phénotype procalcifiant

### 2.2.1.1 Inflammation

Les mécanismes de calcification vasculaire sont amplifiés par un environnement pro-inflammatoire<sup>185,186</sup>. Parmi les mécanismes identifiés *in vitro* chez l'humain, la sécrétion de TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) et d'oncostatine M par les macrophages peut activer l'expression de *Msx2*, *Runx2*, *Osx* et *BSP* (*bone sialoprotein*) dans les cellules musculaires lisses et stimuler la production par ces dernières de phosphatase alcaline et mener à la minéralisation de celles-ci et de leur milieu, notamment *via* la voie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*)<sup>187,188</sup>. L'effet du TNF- $\alpha$  et de l'IL6 sur la transdifférenciation ostéogénique semble également dépendre de l'activation de la voie RANK par la sécrétion de RANKL (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) qui interagit de façon non canonique

avec la voie NF- $\kappa$ B<sup>189,190</sup>. La transdifférenciation et la minéralisation des cellules musculaires lisses *via* l'expression de *Runx2* peut également être obtenue par une exposition chronique à de l'IL4<sup>191</sup>.

L'utilisation d'un modèle de souris « knock out » a également permis l'identification d'IL-1, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), interféron- $\gamma$ , et M-CSF (*colony stimulating factor M*) comme des cytokines procalcifiantes. Cependant, nous devons rester prudents avec ces résultats dans l'extrapolation à l'humain. En effet, il s'agit de lignées murines « knock out » pouvant être soumises à des diètes spécifiques. On peut ainsi trouver dans la littérature des résultats contradictoires sur l'effet pro- ou anti-calcifiant selon le modèle utilisé, comme pour IL-4, IL-6, et GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*)<sup>192</sup>.

### 2.2.1.2 Stress oxydant

Le stress oxydant joue un grand rôle dans l'acquisition d'un phénotype pseudo-ostéoblastique des cellules musculaires lisses vasculaires. Une augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène induit une surexpression de *Runx2*, *via* une activation de la voie de signalisation PI3K/AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase / Protein Kinase B*), ce qui initie l'acquisition d'un phénotype ostéogénique de ces dernières<sup>193</sup>. De même, une augmentation de la NADPH oxydase ou l'augmentation de son activité induite par l'activation des récepteurs RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*) par des produits finaux de glycation avancée suffisent pour activer la transdifférenciation des cellules musculaires ainsi que la minéralisation du milieu extracellulaire *via* la surexpression d'ostéopontine et de phosphatase alcaline<sup>194,195</sup>.

### 2.2.1.3 Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est le site de synthèse des protéines cellulaires. L'augmentation anormale de la production de protéines ou l'accumulation de protéines de conformation anormale ne pouvant être finalisées aboutissent à une saturation de l'organite. C'est le stress du réticulum endoplasmique. Face à cette situation de crise, différentes voies moléculaires, appelées « réponse UPR (*unfolded protein response*) » se mettent en place afin d'augmenter la dégradation et l'élimination des protéines saturant le réticulum. Ce procédé de survie n'est cependant pas anodin et est impliqué dans divers mécanismes pathologiques<sup>196</sup>.

En situation de stress du réticulum endoplasmique, l'expression de *ATF4* (*activating transcription factor 4*) au sein des cellules musculaires lisses est augmentée<sup>197</sup>. ATF4 est l'un des facteurs de transcription impliqués dans la maturation des ostéoblastes et interagit avec *Runx2* pour l'acquisition d'un phénotype procalcifiant<sup>198</sup>. Le stress du réticulum endoplasmique peut enfin être une conséquence directe du stress oxydant. Ainsi, il a été démontré que l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase médiée par BMP-2 induisait un stress oxydant et un stress du réticulum endoplasmique. Ce stress du réticulum induisait une surexpression de *Runx2* *via* la production de son facteur de transcription XBP1 (*X-box binding protein 1*)<sup>199</sup>.

#### 2.2.1.4 Stress mécanique

Le passage du sang contre la paroi du vaisseau crée des forces de friction appelées contraintes de cisaillement ou « *shear stress* ». Ces contraintes peuvent avoir un impact sur le phénotype des cellules endothéliales et favoriser l'apparition de calcification intimale. Ainsi, les contraintes de cisaillement peuvent directement induire une baisse de la production d'oxyde nitrique et augmenter la perméabilité endothéliale et l'inflammation. Cette dernière se fait, entre autres, via une activation par de la voie NF- $\kappa$ B et via une augmentation de la production de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), TNF- $\alpha$ , IL-1 et d'interféron- $\gamma$ <sup>200-202</sup>. Les contraintes de cisaillement activent également la transition endothélio-mésenchymateuse impliquée dans les phénomènes de remodelage vasculaire (muscularisation des artérioles et formation de néo-intima) et faisant intervenir certains gènes communs dans les processus de calcification, tels que *Runx2*<sup>198,198,203-205</sup>. Ces contraintes font des zones de coude ou de rétrécissement, des zones plus sujettes à la calcification<sup>200-202</sup>. Celle-ci étant associée à la formation de plaque d'athérome ou à une rigidification du vaisseau, cela aggrave les contraintes de flux.

Les dommages dus à des contraintes mécaniques peuvent également être source de calcifications médiales. Les modèles animaux ont permis de démontrer que des dommages des couches élastiques, et notamment la dégradation de l'élastine, induisaient une calcification des zones lésées. Ce phénomène s'observe chez les patients souffrant du syndrome de Marfan, une maladie génétique rare, qui se caractérise par une fragmentation de l'élastine au niveau de l'aorte menant à sa calcification<sup>172,206-208</sup>.

#### 2.2.1.5 Mécanismes de réparation de l'ADN

Parmi les autres facteurs favorisant la calcification vasculaire, on peut citer les mécanismes de dommage à l'ADN. Il a en effet été rapporté que la sécrétion de poly(ADP-ribose), produite par la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) en cas de dommage à l'ADN, était associée à une calcification du milieu extracellulaire<sup>209</sup>. La surexpression de PARP1 au niveau des cellules musculaires lisses a également été associée à la transition vers un phénotype ostéogénique. Ainsi, l'interaction de PARP1 avec la voie de signalisation IL6/STAT3 inhiberait l'expression du micro-ARN mir-204, ce qui limiterait son contrôle négatif sur l'expression de *Runx2* et exacerberait les mécanismes procalcifiants. Le blocage de l'expression de *PARP1* ou son inhibition conduisent, à l'inverse, à un blocage de la transdifférenciation ostéochondrogénique<sup>210</sup>.

### 2.2.2 Perte des facteurs inhibant l'acquisition du phénotype procalcifiant

La surexpression de ces facteurs procalcifiants coïncide avec une perte d'expression de facteurs inhibant la calcification tels que la MGP (*Matrix gla protein*), le BMP-7, l'ostéopontine, l'OGP (ostéoprotégérine) ou la fétuine A<sup>164,172,211-213</sup>. Ces inhibiteurs de calcification se retrouvent sous-exprimés localement ou diminués au niveau circulant. Ils sont censés contrebalancer l'expression de facteurs de calcification, soit en inhibant directement

certaines voies de signalisation (par exemple MGP bloque la fixation de BMP-2 à son récepteur<sup>214</sup>), soit en limitant le processus de minéralisation de la matrice extracellulaire, comme le fait l'ostéopontine par exemple<sup>215</sup>. La diminution de ces facteurs est souvent un facteur de mauvais pronostic chez les patients<sup>172</sup>.

## 2.3 Méthode non invasive de quantification de la calcification chez l'humain

### 2.3.1 Radiodensité

La radiodensité est une propriété des tissus relative à leur composition. Elle est le reflet de l'atténuation d'un faisceau d'énergie, des rayons X dans le cas d'une tomodensitométrie, lors de son passage au travers d'une structure. L'unité Hounsfield (UH) est une mesure quantitative et relative de la radiodensité utilisée pour l'interprétation diagnostique de la tomodensitométrie. L'UH est obtenue à partir d'une transformation linéaire des coefficients d'atténuation mesurés en se situant par rapport aux radiodensités arbitrairement attribuées à l'air et à l'eau à pression et température standards. Par exemple, l'air aura une radiodensité très faible (environ -1000 UH) et l'os calcifié aura une radiodensité très importante (environ +1000 UH). Il est donc possible d'estimer la nature d'un tissu et donc d'identifier la calcification en fonction de sa radiodensité.

### 2.3.2 Score d'Agatston

Le score d'Agatston a initialement été établi pour quantifier la calcification des artères coronaires par tomodensitométrie. Cette méthode repose sur la mesure de radiodensité au niveau des coronaires à partir de scans avec des coupes de 3 mm d'épaisseur. Les zones affichant une radiodensité supérieure à 130 unités de Hounsfield (UH) et d'aire supérieure ou égale à 1 mm<sup>2</sup> sont considérées comme calcifiées. L'aire (en mm<sup>2</sup>) et la valeur de radiodensité maximale (en UH) de chacune de ces zones sont mesurées. Un facteur de radiodensité est ensuite attribué à chaque zone en fonction de la radiodensité maximale mesurée: 130-199 UH = 1; 200-299 UH = 2; 300-399 UH = 3; et enfin ≥400 UH = 4. En multipliant ce dernier par l'aire de la lésion de calcification on obtient le score d'Agatston :

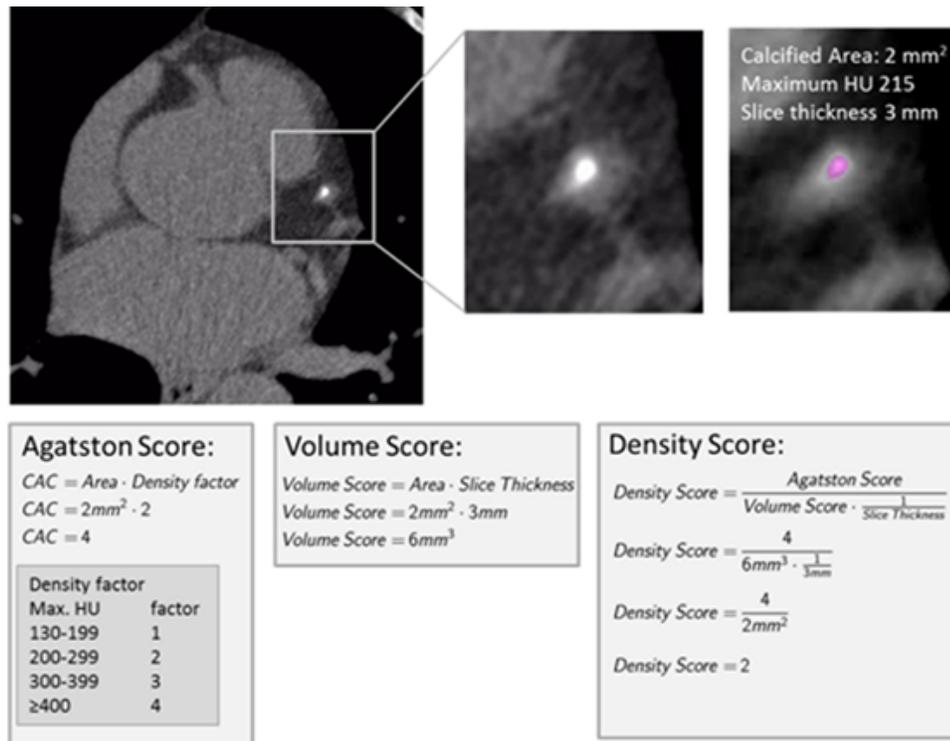
$$\text{Score d'Agatston} = \text{Aire de la calcification (mm}^2\text{)} \times \text{Facteur de calcification}$$

L'opération est répétée sur l'ensemble des coupes obtenues par tomodensitométrie, soit environ 50-60 pour englober l'ensemble des coronaires (Figure 27). La somme de tous ces scores permet d'obtenir le score d'Agatston total<sup>216,217</sup> :

$$\text{Score d'Agatston}_{total} = \sum \text{Score d'Agatston}_{lésion}$$

Le score d'Agatston total permet d'évaluer l'importance de l'atteinte coronarienne selon la classification suivante<sup>216</sup> :

- 0 : pas de preuve de maladie coronarienne
- 1-10 : Maladie coronarienne minimale
- 11-100 : moyenne
- 101-400 : modérée
- >400 : sévère



**Figure 27 : Calcul des différents scores permettant la quantification de la calcification vasculaire<sup>217</sup>.**

*Illustration des différentes méthodes de quantification de la calcification. Chaque méthode permettra d'évaluer un critère de calcification. CAC : Calcium d'artère coronaire.*

### 2.3.3 Score de volume calcique

Le score de volume calcique estime le volume de la lésion calcifiée plutôt que sa densité maximale. Pour ce faire, il faut mesurer l'aire (en mm<sup>2</sup>) de chaque lésion ayant une radiodensité supérieure à 130 UH, puis la multiplier par l'épaisseur de la coupe (en général 3 mm). On obtient ainsi un volume de plaque calcifiée :

$$Score\ de\ volume\ calcique\ (mm^3) = Aire\ de\ la\ lésion(mm^2) \times Epaisseur\ du\ scan\ (mm)$$

Le volume calcique peut également s'obtenir en calculant le volume de voxel composant la lésion (Figure 27). Comme pour le score d'Agatston, la somme des scores de volume calcique donne un score de volume total<sup>216,217</sup> :

$$\text{Score de volume calcique}_{(total)} = \sum \text{Score de volume calcique}_{(lésion)}$$

### 2.3.4 Score de masse calcique

Le score de masse calcique permet quant à lui d'estimer la masse de calcium présent au niveau des vaisseaux. Pour ce faire, on utilise un « fantôme » contenant une série de tubes composant une gamme de concentration d'hydroxyapatite de calcium (CaHA) en solution aqueuse. Cette gamme permet d'établir des valeurs de radiodensité correspondantes pour chaque densité de calcium connue. On peut ainsi déduire pour chaque tube un facteur de calibration permettant le passage d'une valeur à l'autre :

$$\text{Facteur calibration (mg.HU}^{-1}.\text{mm}^{-3}) = \frac{\text{Densité de CaHA (mmg.mm}^{-3})}{\text{Radiodensité}_{\text{étalon}} \text{ (HU)} - \text{radiodensité}_{\text{eau}} \text{ (HU)}}$$

Une fois le facteur de calibration obtenu, il est possible de déduire la masse de calcium présent dans chaque coupe tomodensitométrique. Pour chaque lésion, il faut additionner l'ensemble des valeurs de radiodensité que l'on multiplie ensuite par le volume calcique ainsi que par le facteur de calibration :

$$\text{Score de masse (mg)} = \text{Facteur}_{\text{calib}} \text{ (mg.HU}^{-1}.\text{mm}^{-3}) \times \text{volume (mm}^3) \times \sum \text{radiodensité (HU)}$$

Le facteur de calibration ainsi que le score de masse peuvent être obtenus en voxel plutôt qu'en mm<sup>3</sup>. Comme pour les scores précédents, la somme de l'ensemble des scores de masse calcique donnera un score total pour l'ensemble des vaisseaux étudiés<sup>216-218</sup> :

$$\text{Score de masse calcique}_{(total)} = \sum \text{Score de masse calcique}_{(lésion)}$$

### 2.3.5 Interprétation et limitations

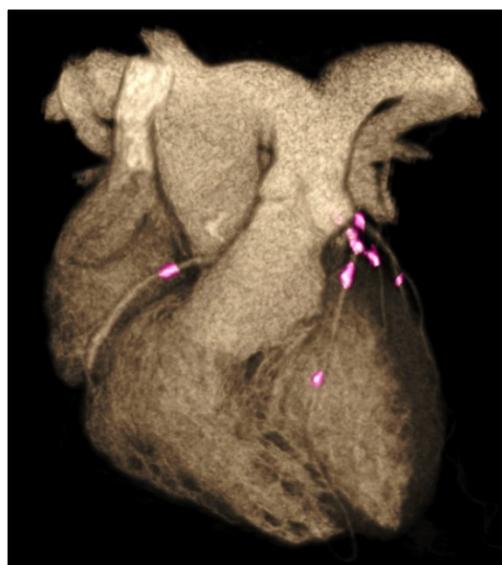
Ces scores permettent une bonne prédiction des risques de maladie coronarienne dans les cohortes de patients. Le score d'Agatston est la méthode de quantification de la calcification la plus utilisée en clinique et en recherche, et a l'avantage d'être très largement documenté. Cependant, ce score présente des limitations dans sa reproductibilité ainsi que dans les variations obtenues lorsque comparé aux scores de volume et de masse calcique. Cela repose en grande partie sur le choix de facteur de radiodensité arbitraire (1, 2, 3 ou 4) donné en fonction de la radiodensité maximale mesurée. Ainsi, l'attribution du facteur de radiodensité peut être

extrêmement zone-dépendant si la calcification est très hétérogène, ou si les valeurs en unité de Hounsfield sont proches d'un seuil (par exemple 199 ou 200 UH, 299 ou 300 UH), ce qui peut changer du simple au double le score d'Agatston attribué à la lésion. Cette absence de facteurs arbitraires rend ainsi les scores de volume et de masse plus reproductibles. Cependant, l'expérience semble montrer que la variabilité des résultats n'est pas suffisante pour changer les recommandations cliniques actuelles à propos du score d'Agatston. De plus, les autres scores présentent également des inconvénients. Le score de volume aura tendance à surestimer le volume des lésions très denses en calcium et, à l'inverse, à sous-estimer celui des lésions de plus faible densité. Le score de masse est quant à lui la seule mesure de la quantité réelle de calcium dans les lésions. Cependant, si la taille de la calcification est un marqueur de pathologie athérosclérotique, la quantité de calcium brute n'est pas en soi le facteur de risque principal. De plus, ce score est relativement peu documenté et utilisé en clinique et en recherche. Enfin, tous ces scores présentent l'inconvénient de ne pas tenir compte de la localisation, de la distribution spatiale, ni du nombre de vaisseaux affectés : une unique zone de calcification sévère aura le même score qu'une multitude de petites lésions réparties sur l'ensemble du lit coronarien (Figure 28), ce qui d'un point de vue clinique et biologique, ne reflète pas le même type de processus pathologique<sup>216,217,219</sup>.



**Agatston Score = 200**

Area of CAC = 50 mm<sup>2</sup>  
 Mean Density = 450 HU (weighting factor = 4)  
 Number of Vessels = 1  
 Pattern = Concentrated  
 Number of Lesions = 2  
 Lesion Type = Large



**Agatston Score = 200**

Area of CAC = 100 mm<sup>2</sup>  
 Mean Density = 232 HU (weighting factor = 2)  
 Number of Vessels = 4  
 Pattern = Diffuse  
 Number of Lesions = 8  
 Lesion Type = Small

**Figure 28 : Illustration d'une des limites du score d'Agatston<sup>216</sup>.**

*Un même score d'Agatston peut illustrer des situations pathologiques et cliniques très différentes. Le score seul n'est donc qu'un indicateur à prendre dans un contexte déterminé.*

Malgré tout, les mesures de calcification, même perfectibles, permettent de chiffrer l'état de calcification global d'une partie du lit vasculaire, en plus du suivi des plaques athérosclérotiques. En effet, au-delà de l'effet obstructif, la calcification vasculaire, même diffuse, a directement un impact sur la rigidification du vaisseau. En limitant grandement l'élasticité et la compliance de ce dernier, la minéralisation de la paroi vasculaire augmente sa résistance à la circulation et surtout son impédance. L'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls et de la pression artérielle pulsée, et la perte de la capacité de stockage de flux du lit vasculaire font de la calcification vasculaire un facteur de risque majeur pour les accidents cardiovasculaires. La quantification de cette dernière par des méthodes standardisées sur de larges cohortes est donc nécessaire afin de documenter le phénomène pour en tirer des informations pertinentes pour le pronostic et le suivi des patients, mais aussi, pour l'étude des mécanismes physiques et moléculaires impliqués au niveau cellulaire<sup>220</sup>.

## Chapitre 3. Calcification vasculaire et HTAP

Dans le cadre de ma maîtrise en sciences cliniques et biomédicales, j'ai été amenée à prendre part aux projets de recherche du groupe de recherche en hypertension pulmonaire des professeurs Provencher et Bonnet au sein du centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec. L'une des thématiques de recherche en cours fut la mise en évidence de processus de calcification vasculaire chez les patients souffrant d'HTAP. En effet, la plupart des facteurs identifiés comme des facteurs favorisant l'acquisition par les cellules musculaires lisses vasculaires d'un phénotype ostéogénique menant à la minéralisation du vaisseau se retrouvent au niveau du lit vasculaire des patients atteints d'HTAP. Au cours de ma maîtrise, j'ai ainsi contribué à étudier l'une des voies moléculaires impliquées dans la transdifférenciation des cellules musculaires lisses artérielles chez ces patients, ainsi que l'identification et la quantification de lésions de calcification vasculaire par imagerie médicale et sur la valeur pronostique de telles données.

### 3.1 Identification de Runx2 comme acteur du remodelage et de la calcification vasculaire en HTAP

#### 3.1.1 Problématique

L'environnement présent au niveau des artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP contient la plupart des facteurs favorisant les processus de calcification. Ainsi, l'inflammation chronique<sup>127,135,136</sup>, le stress du réticulum endoplasmique<sup>221,222</sup>, l'activation de la voie RAGE par la présence de produits finaux de glycation avancée<sup>223,224</sup>, les dommages à l'ADN et l'activation des mécanismes de réparation comme PARP-1<sup>225</sup>, ainsi que les contraintes de cisaillement<sup>226</sup> sont tous impliqués dans la pathogenèse de l'HTAP et pourraient être autant des facteurs de calcification vasculaire. La présence de calcifications avait été décrite en 1970 dans un modèle de rats avec HTP nourris avec des graines de *Crotalaria spectabilis* (d'où est extraite la monocrotaline, une toxine utilisée pour les modèles murins d'HTP) durant 9 mois<sup>227</sup>. Cependant, les mécanismes moléculaires sont restés sous-explorés chez les patients souffrant d'HTAP. L'étude du rôle de Runx2 dans la biominéralisation des vaisseaux chez les patients HTAP fut le sujet de thèse de Grégoire Ruffenach, avec lequel j'ai eu la chance d'apprendre et contribuer en tant que stagiaire.

#### 3.1.2 Hypothèse

Le groupe de recherche a précédemment publié que le dommage à l'ADN observé chez les patients HTAP menait à la surexpression de PARP-1, elle-même conduisant à une diminution de l'expression de miR-204<sup>225</sup>. De plus, notre équipe a également décrit comment la perte de ce micro ARN favorisait l'acquisition du phénotype proliférant et résistant à l'apoptose des cellules musculaires lisses dans le cas de l'HTAP, notamment *via* une

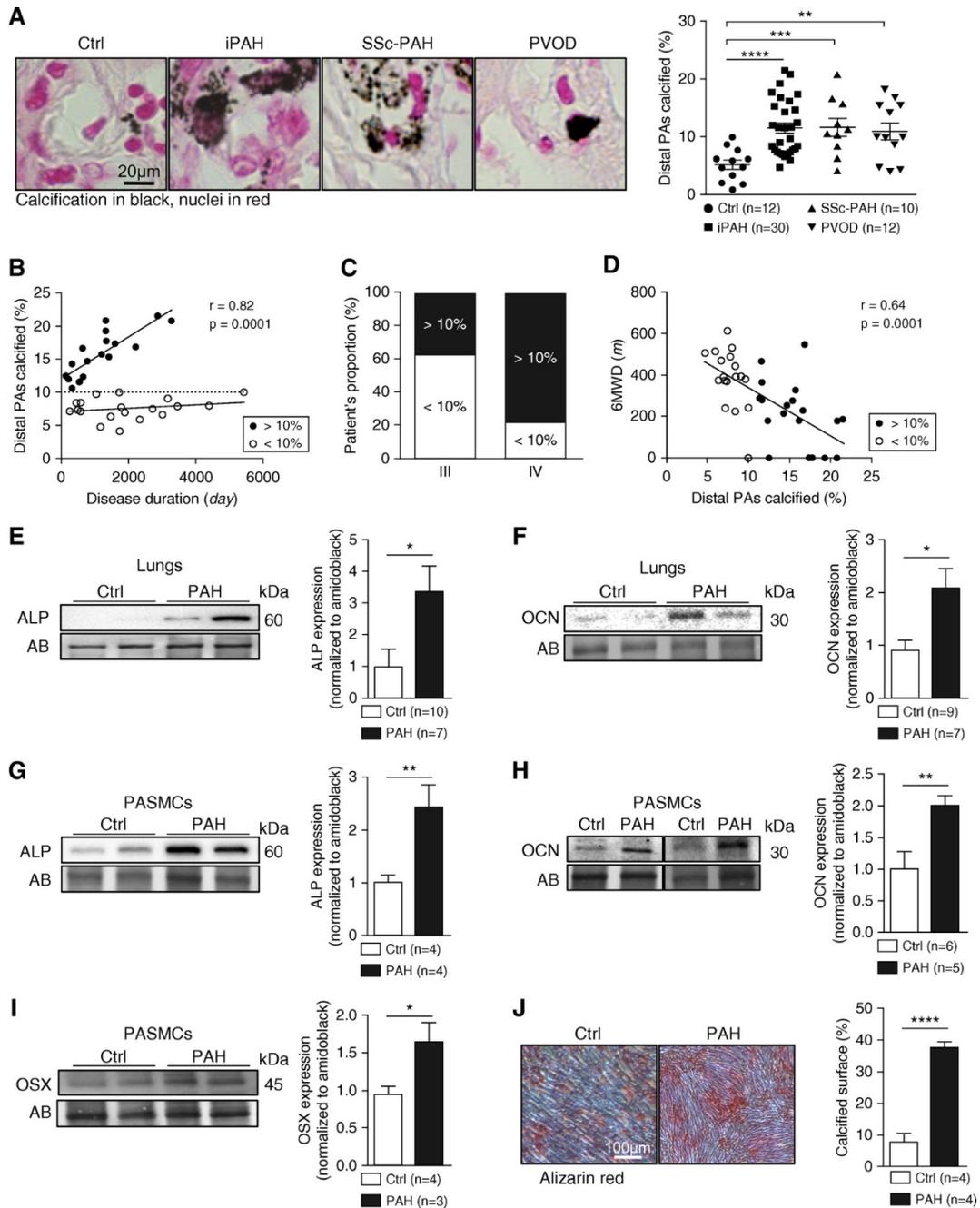
activation de HIF-1 $\alpha$ <sup>228</sup>. Le micro ARN 204 est un répresseur connu de l'expression de *Runx2*<sup>229</sup>. Runx2 est quant à lui un stabilisateur et un promoteur de l'expression de la protéine HIF-1 $\alpha$ <sup>230,231</sup>.

Pour ce projet, nous avons donc émis l'hypothèse que la baisse de miR-204 observée chez les patients HTAP conduisait à une surexpression de Runx2 dans les cellules musculaires lisses, lui-même participant à l'augmentation de HIF-1 $\alpha$ . Cette voie de signalisation favoriserait la prolifération des cellules musculaires lisses et leur résistance à l'apoptose. La surexpression chronique de Runx2 pouvant être également responsable de l'acquisition d'un phénotype pseudo-ostéoblastique, nous avons étudié si cela donnait lieu à une calcification des artères pulmonaires distales des patients avec HTAP. Ce projet étant principalement les travaux de doctorat et de maîtrise de Grégoire Ruffenach et de Sophie Chabot, je ne décrirais ici que les résultats pertinents à mon mémoire. L'ensemble des matériel et méthodes, ainsi que les résultats sont décrits dans les mémoire et thèse de ces derniers. L'article original est annexé au présent manuscrit (Annexe A).

### 3.1.3 Résultats

#### 3.1.3.1 *Les artères de patients atteints d'HTAP présentent des calcifications*

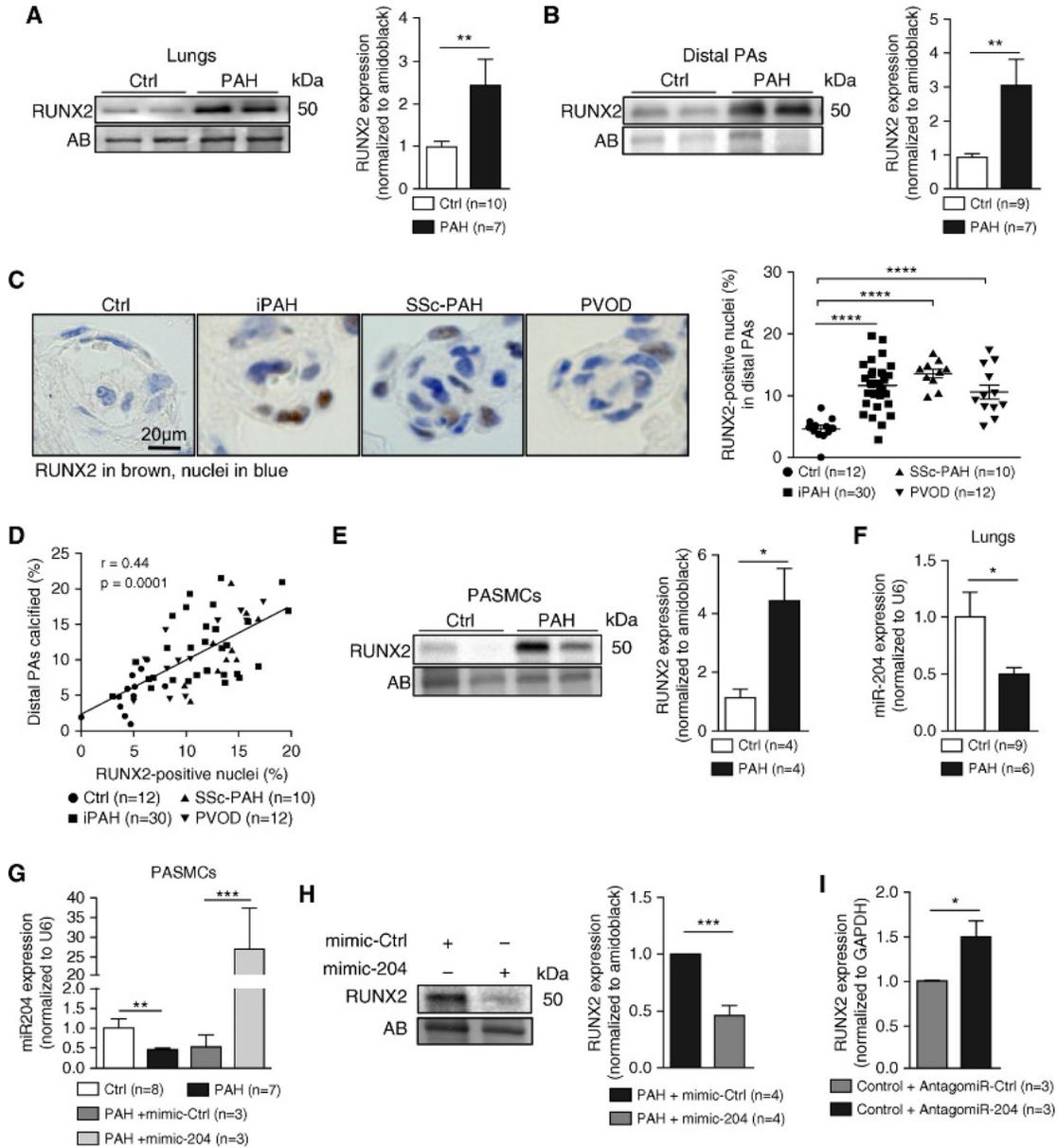
À l'aide d'une coloration de von Kossa, notre équipe a mis en évidence la présence de calcifications au niveau des artérioles pulmonaires des patients avec HTAP (Figure 29A). La présence de calcification dépend de la pathologie, ainsi que de sa durée et de sa sévérité. Ainsi, chez les patients avec HTAPi ou HTAP associée à une sclérodémie ayant plus de 10% de vaisseaux calcifiés, on a pu observer une corrélation entre la durée de la pathologie et le niveau de calcification (Figure 29B). Cette classe de patients est d'ailleurs surreprésentée parmi les patients avec une HTAP de classe fonctionnelle IV (Figure 29C). Dans une moindre mesure, le pourcentage de vaisseaux calcifiés semble être corrélé avec le périmètre de marche au test de marche de 6 minutes (Figure 29D). D'un point de vue moléculaire, ces observations coïncident avec une surexpression de phosphatase alcaline et d'ostéocalcine au niveau des tissus pulmonaires de patients atteints d'HTAP (Figure 29E-F). Les cellules musculaires lisses vasculaires de patients avec HTAP expriment *in vitro* les principaux marqueurs de phénotype ostéogénique que sont la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et ostérix (Figure 29G-I). Enfin, lorsque celles-ci sont exposées à un milieu de culture procalcifiant, elles auront une tendance accrue par rapport aux cellules contrôles à faire des dépôts calciques (ici révélés par coloration à l'alizarine) (Figure 29J).



**Figure 29 : Les patients atteints d'HTAP présentent des calcifications vasculaires impliquant les cellules musculaires lisses.**

*A* : coloration de von Kossa révélant la présence de calcification; *B* : corrélation entre la durée de la pathologie et le niveau de calcification; *C* : répartition de la proportion de patients ayant plus ou moins de 10% de calcification en fonction de leur classe fonctionnelle; *D* : résultats au test de marche de 6 minutes en fonction du pourcentage de calcification; mesure de l'expression par Western blot de la phosphatase alcaline (ALP) (*E*) et ostéocalcine (OCN) (*F*) au niveau pulmonaire; mesure de l'expression par Western blot de phosphatase alcaline (ALP) (*G*), ostéocalcine (OCN) (*H*) et ostérix (OSX) au niveau des cellules musculaires lisses contrôles (Ctrl) et issues de patients HTAP (PAH); *J* : pourcentage de surface de cellules musculaires lisses présentant des dépôts de calcium. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

### 3.1.3.2 Runx2 est surexprimé chez les patients atteints d'HTAP consécutivement à la baisse de miR-204



**Figure 30 : Expression de Runx2 et miR-204 au niveau des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires.**

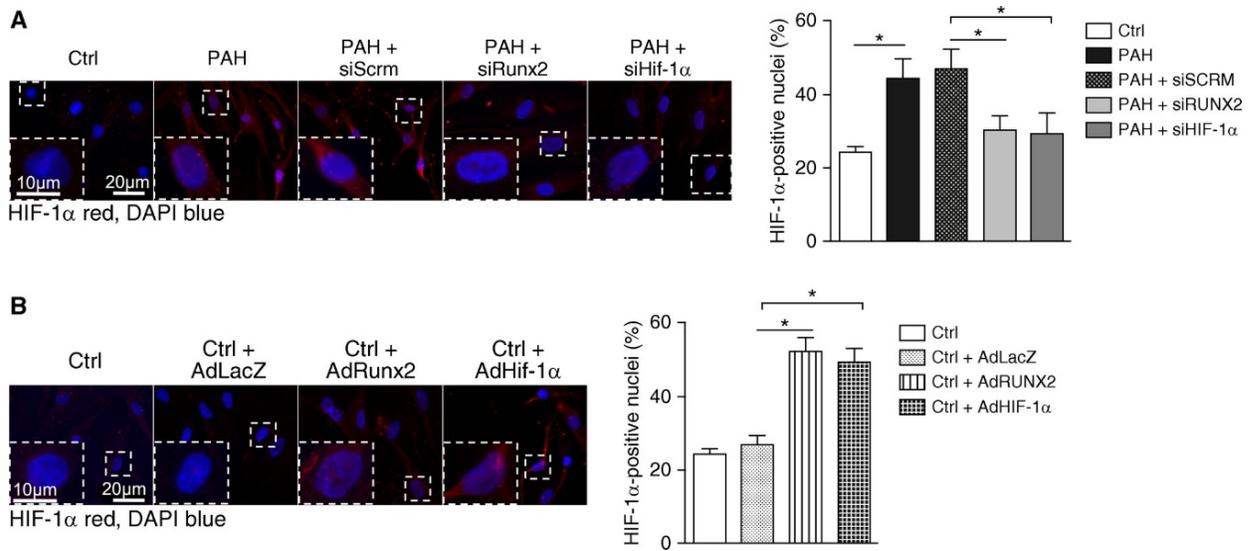
Mesure par Western blot de l'expression de Runx2 au niveau de tissus pulmonaire (A) et d'artères distales (B). C : coloration immunohistochimique de Runx2 et dénombrement du pourcentage de noyaux positifs; D : pourcentage d'artères calcifiées en fonction du pourcentage de noyaux exprimant Runx2; E : expression de Runx2 mesurée dans les cellules musculaires lisses par Western blot; F : mesure de l'expression de miR-204; G : l'utilisation de mimic-204 induit une surexpression de miR-204; H : mesure de l'expression de Runx2 par western blot dans des cellules musculaires lisses traitées ou non au mimic-204; I : mesure de l'expression de Runx2 par western blot dans des cellules musculaires lisses traitées ou non à l'antagomiR-204. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

Les analyses par Western blot ont permis de mettre en évidence une surexpression de Runx2 au niveau des poumons et des artères distales de patients atteints d'HTAP (Figure 30A-B). Cela a été vérifié *in situ* par immunohistochimie (Figure 30C) et le pourcentage de noyaux exprimant le facteur de transcription corrèle avec le taux d'artères distales calcifiées (Figure 30D). *In vitro*, les cellules musculaires lisses surexprimaient le facteur Runx2 (Figure 30E). De façon intéressante, la surexpression de Runx2 coïncidait avec une baisse de l'expression de miR-204 au niveau des poumons et des cellules musculaires lisses de patients avec HTAP (Figure 30F-G). Le lien de causalité entre les niveaux d'expression de Runx2 et miR-204 a été confirmé *in vitro* par l'usage de mimic-204, augmentant l'expression du microARN, et d'antagomiR-204, réprimant son expression. La surexpression de miR-204 s'accompagne d'une répression d'expression de Runx2 (Figure 30G-H). À l'inverse, son inhibition conduit à la surexpression de ce dernier (Figure 30I).

### 3.1.3.3 *Runx2 induit une activation de HIF-1 $\alpha$*

Afin de confirmer que Runx2 contrôlait la nucléarisation de HIF-1 $\alpha$  chez les cellules musculaires lisses de patients atteints d'HTAP, les cellules *in vitro* furent traitées avec un siRunx2 et un siHIF-1 $\alpha$ , 2 siARN neutralisant les ARNm et donc la traduction en protéine de Runx2 et HIF-1 $\alpha$ . Comme attendu, HIF-1 $\alpha$  se trouvait surexprimé chez les cellules de patients avec HTAP avec une forte localisation nucléaire par rapport à celles des contrôles (Figure 31A). L'utilisation de siRUNX2 réduit la nucléarisation de HIF-1 $\alpha$  qui revient au niveau observé chez les cellules contrôles, ou dans le cas de l'utilisation d'un si HIF-1 $\alpha$  (Figure 31A).

À l'inverse, si on force la surexpression de Runx2 chez des cellules contrôles *via* un adénovirus, on observe une augmentation de la production de HIF-1 $\alpha$ , ainsi que de sa translocation nucléaire. Les niveaux de nucléarisation sont similaires lorsque l'on traite les cellules avec un adénovirus pour HIF-1 $\alpha$  (Figure 31B). Ces résultats confirment le rôle modulateur de Runx2 dans l'activation de HIF-1 $\alpha$ .

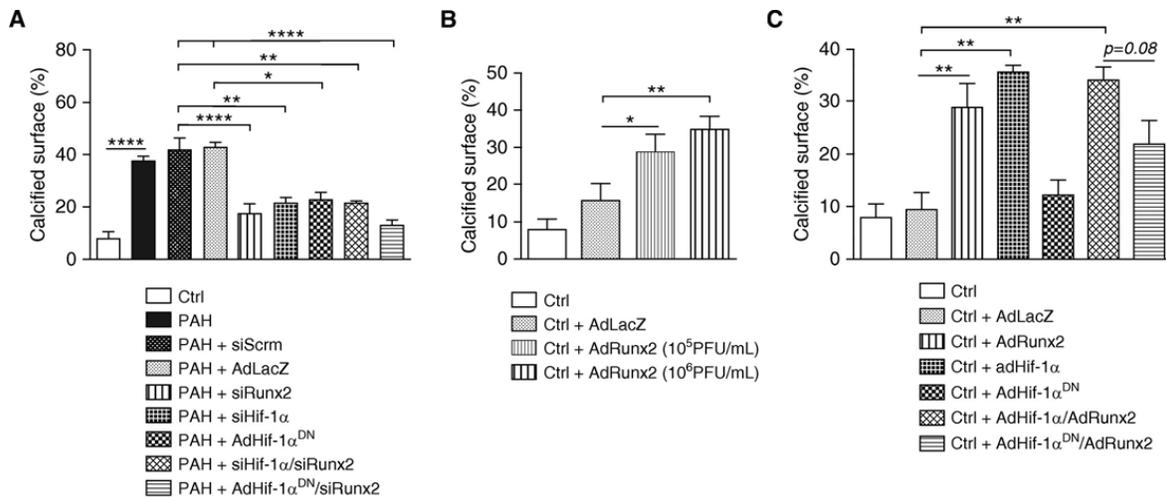


**Figure 31 : La nucléarisation de HIF-1 $\alpha$  est modulée *in vitro* par Runx2.**

Révélation par immunofluorescence de HIF-1 $\alpha$  (en rouge) et du noyau (bleu) de cellules musculaires lisses. A : l'utilisation de siRunx2 et siHIF-1 $\alpha$  induit une baisse de nucléarisation de HIF-1 $\alpha$ . B : La surexpression de Runx2 et HIF-1 $\alpha$  par adénovirus induit une augmentation de la nucléarisation de HIF-1 $\alpha$ . siScrm : siRNA contrôle; siRunx2 : siRNA Runx2; AdLacZ : adénovirus LacZ contrôle; adRunx2 : adénovirus Runx2. \*P < 0.05.

#### 3.1.3.4 La voie Runx2/HIF-1 $\alpha$ favorise la calcification *in vitro*

Afin de valider le rôle de Runx2 dans l'acquisition d'un phénotype ostéogénique, des cellules musculaires lisses de patients atteints d'HTAP ont été exposées à un siRunx2, siHIF-1 $\alpha$  ou à des adénovirus AdRunx2, AdHif-1 $\alpha$  ou AdHif-1 $\alpha$ <sup>DN</sup> (surexprimant une forme dominante négative de HIF-1 $\alpha$ ). Le pourcentage de calcification a été mesuré par coloration à l'alizarine. Il en ressort que l'inhibition de Runx2 et/ou HIF-1 $\alpha$  réduit la tendance des cellules musculaires lisses à la calcification (Figure 32A). Chez des cellules contrôles, un traitement avec un adénovirus AdRunx2 induit une calcification proportionnellement à la concentration en adénovirus (Figure 32B). Enfin, si la surexpression de Runx2 et HIF-1 $\alpha$  induit une hausse de la calcification chez les cellules contrôles seuls ou en combinaison, cet effet est diminué dans le cas d'un traitement AdRunx2/AdHif-1 $\alpha$ <sup>DN</sup>, suggérant un effet de Runx2 via HIF-1 $\alpha$  (Figure 32C).

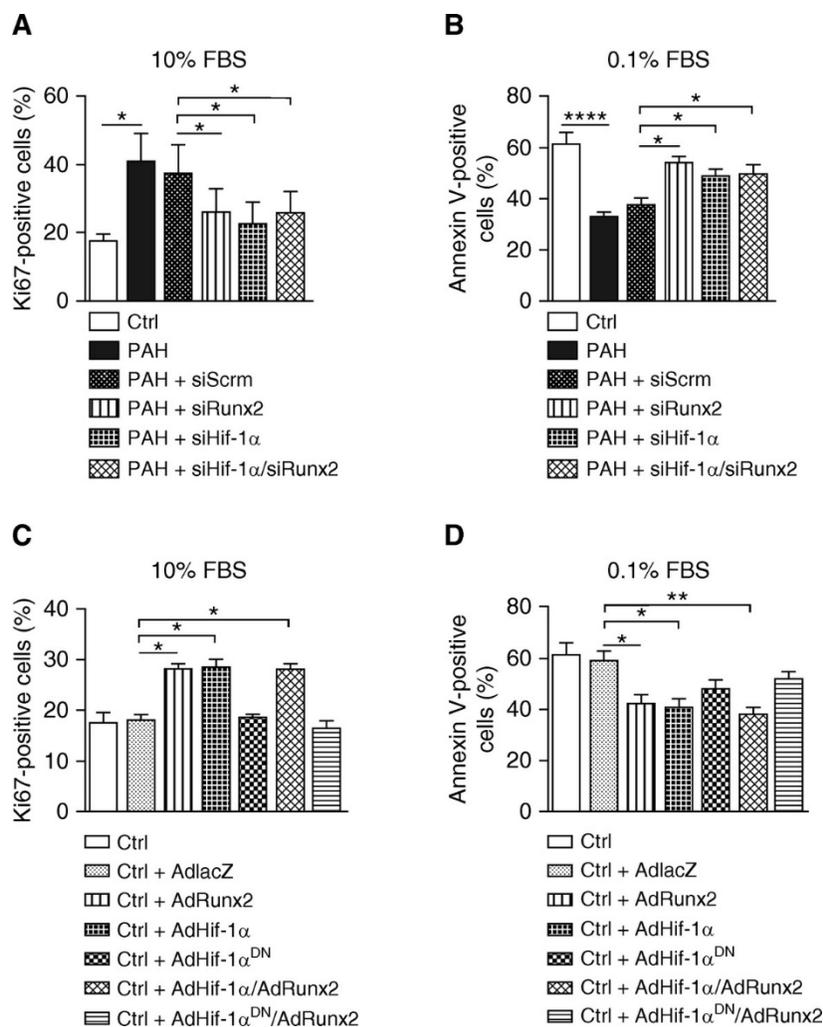


**Figure 32 : Influence de l'expression de Runx2 et HIF-1 α sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires.**

Pourcentage de surface de cellules musculaires lisses de patients HTAP présentant des dépôts de calcium en fonction de différentes conditions. SiSCRM : siRNA contrôle; adLacZ; adénovirus LacZ contrôle; siRunx2 : siRNA Runx2; adRunx2 : adénovirus Runx2; siHIF-1α : siRNA HIF-1α; adHIF-1α : adénovirus HIF-1α; adHIF-1α<sup>DN</sup> : adénovirus HIF-1α dominant négatif. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

### 3.1.3.5 La voie Runx2/HIF-1α favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose

L'équipe de recherche a ensuite validé par les mêmes traitements que l'activation de la voie Runx2/HIF-1α conduisait à l'acquisition d'un phénotype hyperprolifératif (quantification des noyaux positifs au Ki67) et anti-apoptotique (quantification des cellules positives à l'annexine V) des cellules musculaires lisses vasculaires HTAP et contrôles. Il en résulte que le blocage de la traduction de Runx2 et/ou HIF-1α par siARN induit une baisse de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules HTAP (Figure 33A-B). À l'inverse, la surexpression de Runx2 et/ou HIF-1α par adénovirus favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose de cellules contrôles. Cet effet n'est pas significatif lorsque l'adénovirus AdRunx2 est utilisé en combinaison avec un adénovirus AdHif-1α<sup>DN</sup>, ce qui confirme que l'effet de Runx2 sur la prolifération et l'apoptose passe par l'activation de HIF-1α (Figure 33C-D).



**Figure 33 : Effet de l'expression de Runx2 et HIF-1α sur la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires.**

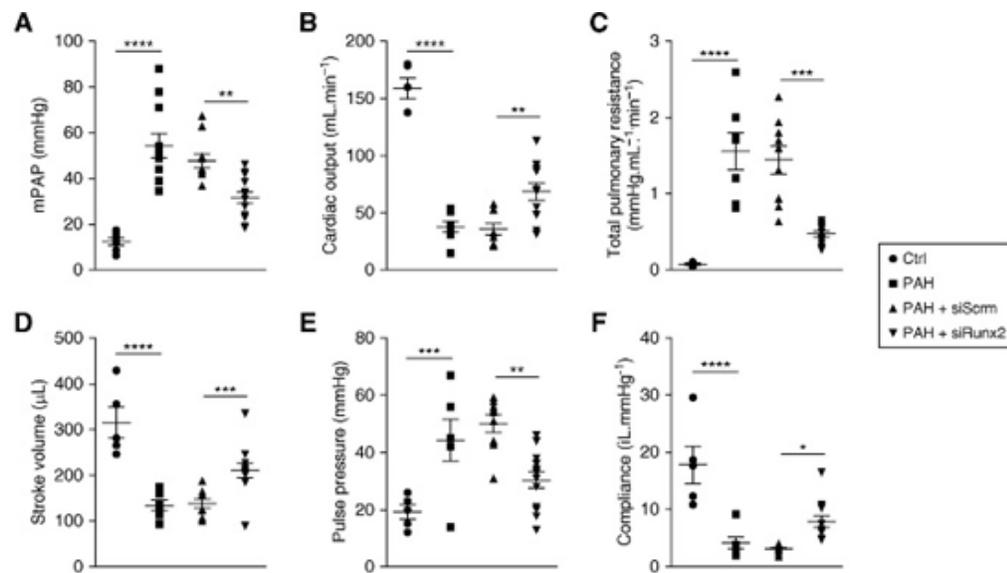
Pourcentage de cellules musculaires lisses de patients HTAP en prolifération (immunofluorescence de Ki67) (A, C) et en apoptose (immunofluorescence d'annexinV) (B, D). SiSCRM : siRNA contrôle; adLacZ; adénovirus LacZ contrôle; siRunx2 : siRNA Runx2; adRunx2 : adénovirus Runx2; siHIF-1α : siRNA HIF-1α; adHIF-1α : adénovirus HIF-1α; adHIF-1α<sup>DN</sup> : adénovirus HIF-1α dominant négatif. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

### 3.1.3.6 L'inhibition de Runx2 améliore l'HTP des rats Sugen/hypoxie

Les résultats *in situ* et *in vitro* présentés semblent tous confirmer une surexpression anormale de Runx2 au niveau des cellules musculaires lisses des petites artères pulmonaires distales. Cette activation induit un phénotype procalcifiant, hyperprolifératif et anti-apoptose *via* l'activation de HIF-1α. Cette surexpression de Runx2 semble être associée à la baisse du taux de miR-204 observée en HTAP.

Afin de valider cette nouvelle voie de signalisation *in vivo* et son intérêt thérapeutique, notre équipe a utilisé le modèle de rats traités au Sugen et mis en hypoxie. Ce modèle permet d'obtenir des rats présentant une HTAP avec un remodelage vasculaire similaire à ce qui est observé chez les patients. Pour ce protocole, les rats ont reçu une injection de Sugen, un antagoniste des récepteurs au VEGF visant les cellules endothéliales, puis sont mis 3 semaines en conditions hypoxiques (10% de dioxygène), puis en condition normoxique. À partir du 35<sup>e</sup> jour, la présence d'une HTAP est confirmée par échocardiographie Doppler. Certains rats ont reçu tous les 3 jours des nébulisations intratrachéales de siRunx2 ou siARN contrôle (siSCRM). Après 2 semaines de traitement, les rats ont des cathétérisme cardiaque, puis sont sacrifiés.

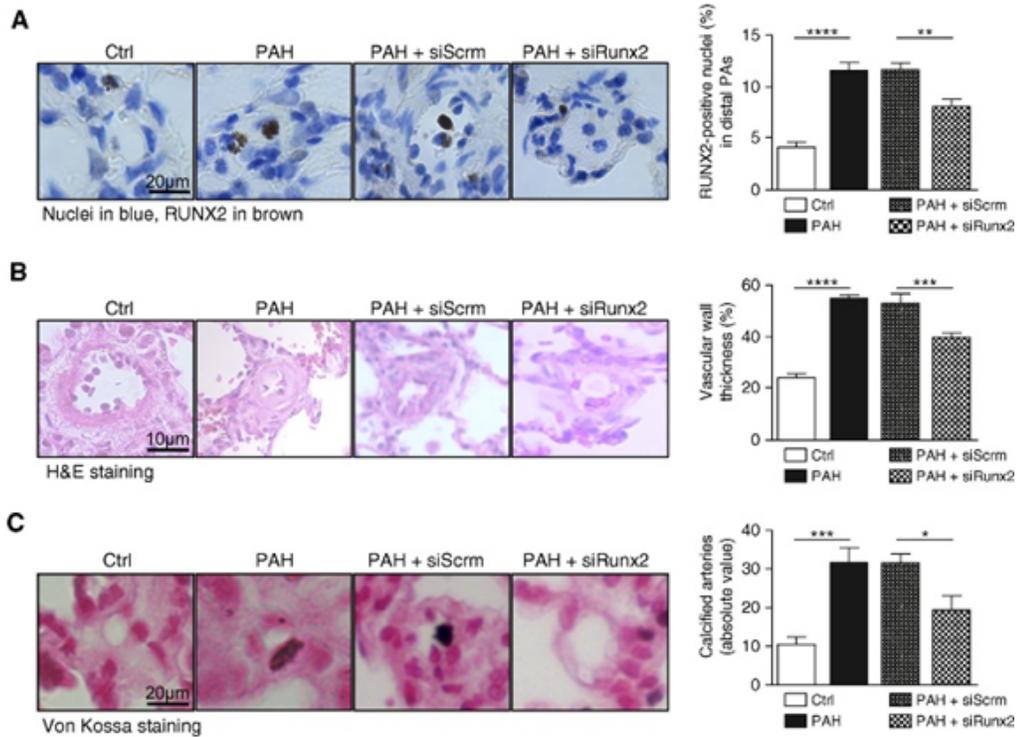
Comparativement aux rats avec HTAP n'ayant reçu aucun traitement ou ceux ayant eu le siSCRM, les rats HTAP+siRunx2 présentaient une nette amélioration de leurs paramètres hémodynamiques (Figure 34A-E). De plus, ces rats présentaient une amélioration de la compliance de l'artère pulmonaire couplée à une amélioration du volume d'éjection du ventricule droit et des pressions pulsées (Figure 34D-E).



**Figure 34 : L'inhibition de Runx2 améliore *in vivo* l'hypertension pulmonaire dans le modèle Sugen/hypoxie.**

A : pression moyenne dans l'Artère pulmonaire; B : débit cardiaque; C : résistance pulmonaire totale; D : volume d'éjection cardiaque; E : pression pulsée; F : compliance vasculaire. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

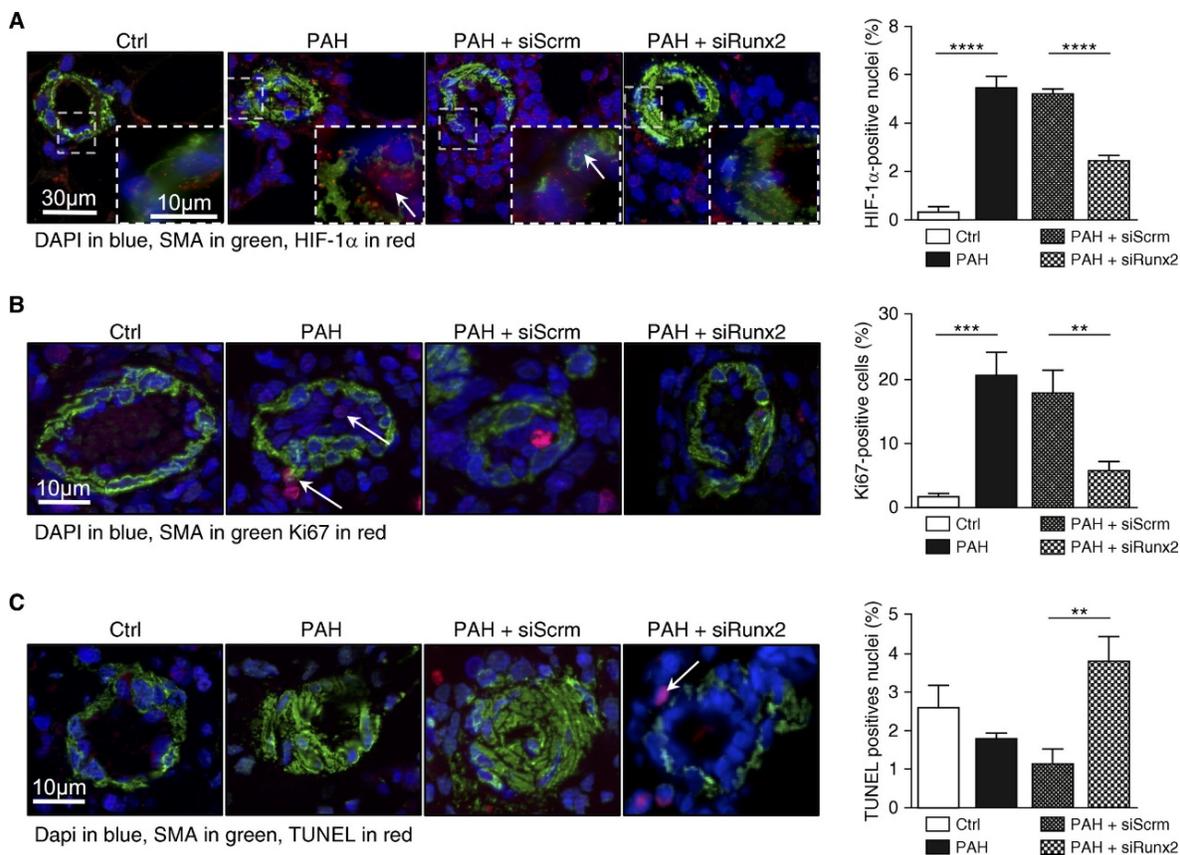
Afin de valider si cet effet bénéfique de la nébulisation de siRunx2 est bien dû à une inhibition de l'expression de la protéine au niveau des cellules musculaires lisses, celle-ci a ensuite été mesurée par immunohistochimie. Il a aussi été observé que la réduction de l'expression de Runx2 s'accompagnait d'une baisse des microcalcifications observées ainsi que d'une diminution du remodelage des petites artères (Figure 35A-C).



**Figure 35 : L'inhibition de Runx2 améliore *in vivo* le remodelage vasculaire et les calcifications dans le modèle Sugen/hypoxie.**

A : mesure par immunohistochimie de l'expression de Runx2 dans des vaisseaux pulmonaires de rats Sugen/hypoxie traités ou non au siRunx2. B : mesure du pourcentage d'épaisseur vasculaire par coloration Hématoxyline/éosine; C : coloration de dépôts de calcium au niveau de vaisseaux pulmonaire par von Kossa. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Finalement, l'inhibition de Runx2 au niveau vasculaire s'accompagne d'une baisse de translocation nucléaire de HIF-1 $\alpha$  (Figure 36A), confirmant *in vivo* la voie de signalisation observée *in vitro*. Nous avons constaté que la répression de l'expression de Runx2 et la baisse d'activation de HIF-1 $\alpha$  qui en a découlé ont permis également de diminuer la prolifération (Ki67) et d'augmenter l'apoptose (Annexine V) au niveau des artères des rats HTAP (Figure 36B-C).



**Figure 36 : L'inhibition de Runx2 améliore *in vivo* le remodelage vasculaire.**

*L'inhibition de Runx2 réduit le remodelage vasculaire via une baisse d'activation de HIF-1α et une correction du phénotype proliférant et résistant à l'apoptose des cellules musculaires lisses. A : mesure de l'expression de HIF-1α (rouge) au niveau des noyaux (bleu) de cellules musculaires lisses exprimant de l'actine du muscle lisse (vert). B : mesure de l'expression de Ki67 (rouge), signe d'une prolifération en cours, au niveau des noyaux (bleu) de cellules musculaires lisses exprimant de l'actine du muscle lisse (vert). C : mesure de l'apoptose par TUNEL (rouge) au niveau des noyaux (bleu) de cellules musculaires lisses exprimant de l'actine du muscle lisse (vert). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.*

### 3.1.4 Discussion

L'HTAP est une maladie rare caractérisée par un remodelage important du lit vasculaire distal. Il est en grande partie dû à la perte de régulation de la prolifération et de l'apoptose des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Ce phénotype pathologique est la conséquence de modifications complexes de l'environnement cellulaires faisant intervenir de l'inflammation, des stress mécaniques, des stress du réticulum endoplasmique et du dommage à l'ADN. L'ensemble de ces facteurs sont également des facteurs favorisant les calcifications vasculaires, notamment *via* la dérégulation de facteurs de transcription favorisant l'acquisition d'un phénotype cellulaire pseudo-ostéogénique. Le travail du groupe de recherche en hypertension pulmonaire a permis de mettre en évidence des signes de calcifications des petites artères distales chez les patients atteints d'HTAP. Cela pourrait avoir des conséquences sur la compliance vasculaire pulmonaire et devenir possiblement un

facteur de mauvais pronostic pour les patients. En plus du phénomène de calcification, le nouveau mécanisme moléculaire décrit semble être un acteur majeur du changement de phénotype observé dans le développement de la pathologie. Ainsi, la perte d'expression de miR-204 et la dérégulation de Runx2 qui en découle permettent d'expliquer en partie l'acquisition du phénotype hyperprolifératif et anti-apoptotique des cellules musculaires lisses tel qu'observé dans l'HTAP humaine et les modèles animaux. Cette voie miR-204/Runx2/HIF-1 $\alpha$  (Figure 37) est d'autant plus intéressante, car elle semble être une cible thérapeutique prometteuse aux vues des résultats dans le modèle de rats Sugén/hypoxie. Ce travail a été publié en 2016 dans l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*<sup>102</sup> (Annexe A).

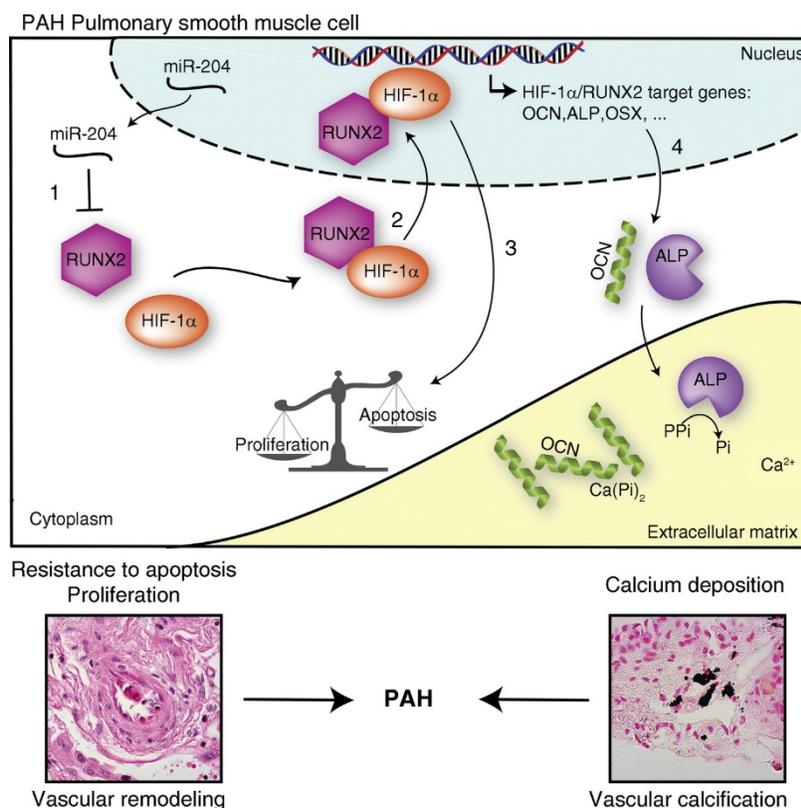


Figure 37 : Schéma récapitulatif de la voie de signalisation miR-204/Runx2/HIF-1 $\alpha$

### 3.2 Radiodensité des artères pulmonaires en hypertension artérielle pulmonaire : un signe de calcification précoce ?

#### 3.2.1 Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire caractérisée par un remodelage et une oblitération progressive des artères pulmonaires distales menant ultimement à une insuffisance ventriculaire droite et au décès. Notre équipe ayant démontré que certains mécanismes cellulaires impliqués dans le

remodelage vasculaire pouvaient donner lieu à de la calcification au niveau des petites artérioles distales, nous nous sommes questionnés à savoir si de telles lésions de remodelage pourraient être visibles à la tomодensitométrie sur les artères de plus gros calibres.

Nous avons émis l'hypothèse que les anomalies procalcifiantes des artères pulmonaires en HTAP pourraient se manifester par une radiodensité accrue de la paroi des artères pulmonaires à la tomодensitométrie et corréleraient avec le pronostic à moyen terme. Les tomодensitométries pulmonaires de 84 patients atteints d'HTAP et de témoins appariés furent examinées rétrospectivement. Nous avons développé une technique similaire au score d'Agatston pour évaluer la radiodensité vasculaire. Trois coupes transversales standardisées furent utilisées pour déterminer le nombre d'artères pulmonaires visibles et la plus haute valeur d'unité Hounsfield (UH) de leur paroi. L'association entre les paramètres radiologiques et les informations cliniques telles que les marqueurs de sévérité et de détérioration clinique et la survie fut évaluée.

Nous avons observé une augmentation significative de la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires chez les patients atteints d'HTAP par rapport aux témoins ( $176,1 \pm 70,7$  vs  $118,4 \pm 52,4$  UH,  $p < 0,0001$ ). Parmi les patients atteints d'HTAP, le niveau de radiodensité vasculaire au niveau pulmonaire corrélait avec une augmentation du risque de décès ou détérioration clinique (rapport de risque 1,06 par 10 UH; intervalle de confiance de 95%, 1,02-1,10;  $p = 0,002$ ). L'analyse tissulaire de poumons de patients atteints d'HTAP a démontré qu'une augmentation de la radiodensité des artères pulmonaires est associée à des marqueurs de calcification *in situ* ( $r^2 = 0,7674$ ,  $p = 0,026$ ), dont le rôle fut précédemment proposé dans la pathogenèse de l'HTAP. De façon intéressante, dans notre cohorte, la valeur pronostique de la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires semblait être indépendante des marqueurs de sévérité traditionnels en HTAP (tous  $p > 0,05$ ).

En somme, cette étude met en évidence l'utilité de la tomодensitométrie et de la radiodensité des artères pulmonaires dans le pronostic de l'HTAP. Elle a fait l'objet d'une publication en 2019 dans l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*<sup>232</sup> (Annexe B).

### 3.2.2 Problématique

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave et évolutive caractérisée par une résistance vasculaire pulmonaire élevée, conduisant ultimement à une insuffisance ventriculaire droite et à un décès prématuré<sup>127</sup>. En plus de la vasoconstriction et de la thrombose, la prolifération cellulaire et la transdifférenciation endothéliale<sup>105</sup> sont de plus en plus reconnues comme les principaux facteurs contribuant au remodelage et au rétrécissement vasculaires. Éventuellement, la paroi vasculaire s'épaissit et le lit vasculaire perd de sa compliance et gagne en résistance<sup>233,234</sup>.

Les mécanismes physiopathologiques du remodelage progressif des artères pulmonaires en HTAP sont mal compris. Cependant, l'HTAP présente des similitudes avec d'autres vasculopathies impliquant un épaississement et une rigidité artérielle, telles que l'athérosclérose<sup>235-237</sup>. À propos de cette affection fibroproliférative, plusieurs études ont démontré que les calcifications vasculaires étaient courantes et associées à un risque accru de mortalité cardiovasculaire de toutes causes confondues<sup>238</sup>. Au cours des dernières décennies, la tomодensitométrie cardiaque sans contraste a progressivement été reconnue comme une méthode non invasive et fiable pour évaluer le fardeau de plaques athérosclérotiques<sup>239</sup>. Ainsi, les calcifications athérosclérotiques, des coronaires<sup>240-242</sup> ou des principaux vaisseaux systémiques<sup>238,243,244</sup>, détectées par tomодensitométrie, ont été démontrées comme des facteurs de risque indépendants d'événements coronariens, d'insuffisance cardiaque et de mortalité. Des données plus récentes suggèrent que le volume et la densité de la plaque recèlent des informations supplémentaires en ce qui concerne le risque d'événements cardiovasculaires<sup>245</sup>. En plus de fournir des informations pronostiques<sup>243,246</sup>, la tomодensitométrie sans contraste est ainsi devenue un outil de diagnostic établi dans la pratique clinique<sup>247,248</sup>.

La calcification vasculaire est un processus actif induit par des mécanismes cellulaires. La calcification médiale est caractérisée par l'acquisition d'un phénotype ostéogénique des cellules musculaires lisses en réponse à plusieurs stimuli athérogènes de l'environnement, tels que le stress mécanique et le stress oxydatif<sup>165,183</sup>. Dans les vaisseaux systémiques, la calcification vasculaire débute sous forme de microcalcifications qui évoluent au fur et à mesure que la plaque progresse<sup>249</sup>. Tel qu'énoncé précédemment, notre équipe a démontré que des calcifications microscopiques peuvent être observées dans les artères pulmonaires des patients atteints d'HTAP au stade terminal<sup>102</sup>. De plus, des calcifications évidentes des artères pulmonaires ont également été décrites à quelques reprises à la tomодensitométrie de patients atteints d'HTAP de longue date<sup>250</sup>.

### 3.2.3 Hypothèses

Considérant la relation entre la radiodensité et le remodelage vasculaire des vaisseaux systémiques et coronariens à la tomодensitométrie sans contraste<sup>251</sup>, nous avons émis l'hypothèse que la radiodensité accrue de la paroi des artères pulmonaires pourrait être un phénomène précoce observé au moment du diagnostic d'HTAP. Comme dans le cas des maladies cardiovasculaires, nous avons également cherché à déterminer si cette radiodensité des artères pulmonaires corrélait avec les marqueurs de sévérité de la maladie et son pronostic. Une partie des résultats présentés ont fait l'objet d'une publication en 2018 dans l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*<sup>232</sup> (Annexe B).

### 3.2.4 Objectifs

L'objectif principal était de quantifier et de comparer la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires distales de patients atteints d'HTAP et de témoins appariés. L'objectif secondaire était d'évaluer la corrélation de la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires avec les marqueurs de sévérité usuels en HTAP, ainsi que d'évaluer la valeur pronostique de cette mesure.

### 3.2.5 Matériel et méthodes

Cette étude rétrospective a été approuvée par notre comité d'éthique institutionnel (CER 20773) et a été réalisée conformément à l'Énoncé de politique des trois Conseils, et à la Déclaration d'Helsinki. Comme l'étude était non interventionnelle et que toutes les données ont été colligées de façon anonyme, le comité d'éthique a renoncé à la nécessité d'un consentement éclairé signé par les participants.

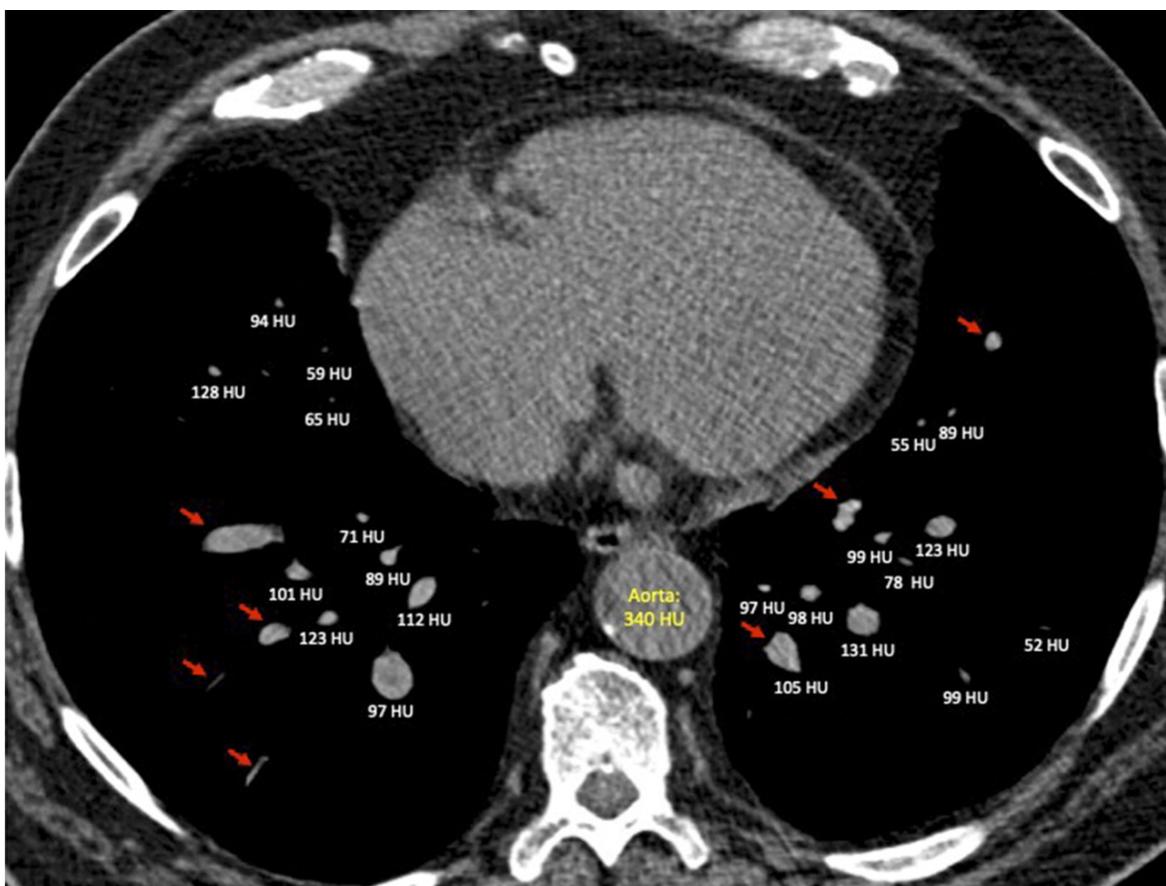
#### 3.2.5.1 *Participants*

Les patients qui furent diagnostiqués d'une HTAP idiopathique ou héréditaire, d'une HTAP associée à une exposition à un anorexigène ou à la sclérodémie (HTAP-SSc), ou encore d'une maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) entre 2006 et 2017 ont été identifiés *via* la base de données de la clinique des maladies vasculaires pulmonaires de l'IUCPQ. Le diagnostic d'HTAP fut posé conformément aux lignes directrices en vigueur<sup>49,126</sup>. Plus spécifiquement, le diagnostic de MVOP fut confirmé pathologiquement à l'autopsie ou à la suite d'une transplantation pulmonaire chez 9 patients, ou était cliniquement diagnostiquée comme hautement probable sur la base de la capacité de diffusion pulmonaire, de la tomодensitométrie thoracique à haute résolution et du lavage broncho-alvéolaire chez 12 autres patients<sup>84</sup>. Les patients étaient éligibles à l'étude s'ils avaient réalisé un test de marche de 6 minutes et une tomодensitométrie thoracique sans contraste dans les trois mois suivant leur cathétérisme cardiaque droit initial. Les patients ont été appariés individuellement pour le sexe et l'âge avec des témoins sains (en cas d'HTAP idiopathique ou de MVOP) et atteints de sclérodémie sans HTP, en cas d'HTAP ou de MVOP associées à la sclérodémie, qui avaient subi une tomодensitométrie sans contraste ne montrant aucun signe significatif d'atteinte parenchymateuse. Certains participants furent exclus en raison d'une piètre qualité d'image tomодensitométrique empêchant l'analyse.

#### 3.2.5.2 *Tomодensitométrie multibarrette et analyse d'image*

Les images de tomодensitométrie thoracique furent acquises en pleine inspiration en position de décubitus dorsal, sans contraste. Les images ont été obtenues avec un kilo voltage de 120 kVp (n = 104) ou 140 kVp (n = 64) et avec des coupes d'épaisseur de 1 mm. Un algorithme de reconstruction standard pour les poumons fut utilisé avec différents intervalles de reconstruction. Les images furent examinées et analysées à l'aveugle. La radiodensité des vaisseaux visibles fut mesurée sur trois coupes axiales soigneusement choisies: 1) 1 cm au-

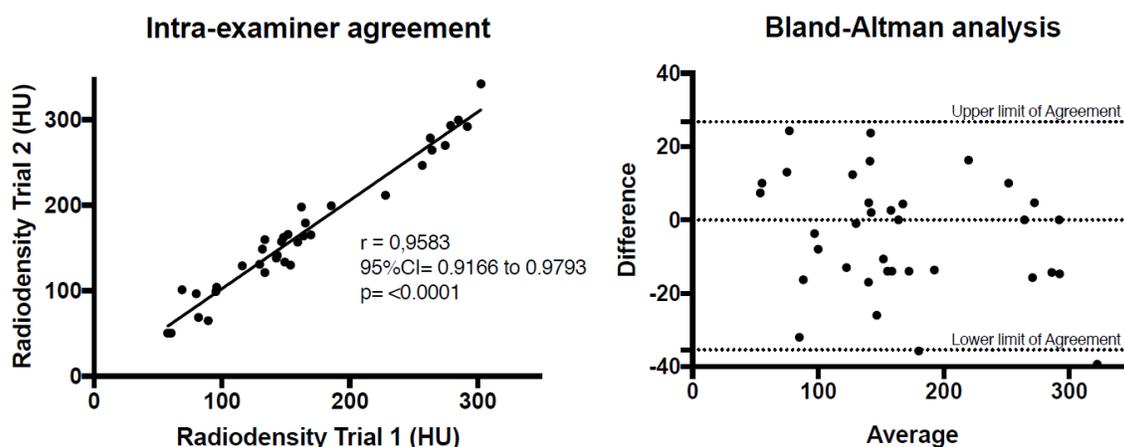
dessus de l'arc aortique; 2) 1 cm en dessous de la carène, et; 3) 1 cm en dessous de la veine pulmonaire inférieure droite. Les images furent analysées en fenêtre médiastinale avec le logiciel d'imagerie médicale Impax Agfa HealthCare (Mortsel, Belgique). Les vaisseaux visibles furent dénombrés et la radiodensité maximale de leurs parois fut mesurée en unités Hounsfield (UH). Ensuite, la radiodensité moyenne fut calculée pour chaque patient (Figure 38). Seuls les vaisseaux dont la radiodensité maximale de leur paroi était supérieure à 50 UH furent pris en compte dans l'analyse afin de minimiser le biais de mesure dû au contenu des vaisseaux ou aux éléments environnants, tels que le parenchyme pulmonaire par exemple. La validité de cette mesure non invasive fut évaluée dans une cohorte de 8 patients atteints d'HTAP pour laquelle une tomодensitométrie du thorax réalisée dans les 2 semaines précédant leur transplantation pulmonaire était disponible. En bref, la radiodensité moyenne des artères pulmonaires pour chaque patient fut corrélée à la calcification in situ des artères pulmonaires distales évaluées à l'aide de la coloration de Von Kossa, comme nous l'avons décrit précédemment<sup>102</sup>. La radiodensité maximale de la paroi de l'aorte thoracique descendante fut évaluée de manière similaire sur les deux coupes inférieures.



**Figure 38 : Exemple d'image de tomодensitométrie thoracique.**

*Les radiodensités maximales de la paroi de chaque artère sont indiquées sous celles-ci. Les flèches rouges indiquent les veines.*

Afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures de radiodensité maximale, des tomographies furent analysées pour une deuxième fois, toujours en aveugle, puis une analyse de reproductibilité intraexamineur ainsi qu'une analyse de Bland-Altman furent conduites. Ces analyses ont permis de mettre en lumière une très grande fidélité des mesures faites (Figure 39). Un modèle bidirectionnel à effets mixtes et une définition d'accord absolu ont été choisis. Le coefficient de corrélation intra-classe étant de 0,958 (95% CI 0,917-0,979,  $p < 0,0001$ ), avec un biais moyen de -4 UH et des limites d'accords à 95% de -35 à +127 UH, nous pouvons conclure que les mesures ont été faites de façon très reproductible.



**Figure 39 : Les analyses de reproductibilité confirment la concordance des mesures effectuées.**

### 3.2.5.3 Collecte des données cliniques

Les données démographiques et cliniques de tous les patients ont été recueillies à partir des dossiers de l'hôpital. Les informations recueillies comprenaient: l'âge au moment de l'acquisition de la tomographie, le sexe, le poids, la taille, les comorbidités et les antécédents médicaux, les médicaments, le taux d'hémoglobine, la fonction rénale (taux sérique de créatinine) et les informations de suivi. Pour les patients atteints d'HTAP, la classe fonctionnelle selon l'échelle de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), le type d'HTAP, la date du diagnostic et la date approximative d'apparition des symptômes, ainsi que les résultats du test de marche de 6 minutes et du cathétérisme cardiaque droit furent notés. Le test de marche de 6 minutes fut réalisé conformément aux recommandations actuelles<sup>252</sup>. La compliance de la circulation pulmonaire fut estimée telle que le volume d'éjection divisé par la pression pulsée<sup>233,253</sup>. La date du décès ou de la transplantation pulmonaire furent également recueillies pour les patients atteints d'HTAP. La survenue d'une détérioration clinique fut définie tel qu'établi dans la littérature<sup>254</sup> comme un critère composite comprenant : une dégradation de la classe fonctionnelle, une réduction de 15% ou plus du périmètre de marche au test de marche de 6 minutes, une hospitalisation liée à l'HTAP, une transition vers un analogue de la prostacycline administré par voie parentérale, ou encore la transplantation ou le décès.

#### 3.2.5.4 *Analyses statistiques*

Les caractéristiques des patients sont exprimées en nombres et en pourcentages pour les variables catégorielles, et en moyenne  $\pm$  écart type pour les variables continues. Les variables continues ont été comparées à l'aide du test de rang de Mann-Whitney ou de Wilcoxon selon la normalité de la distribution évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Chez les patients atteints d'HTAP, l'association entre la radiodensité des artères pulmonaires et la durée de la maladie et les marqueurs traditionnels de sévérité de la maladie (classe fonctionnelle, test de marche de 6 minutes, index cardiaque, pression moyenne de l'artère pulmonaire, résistance et compliance) fut évaluée à l'aide des corrélations de Spearman ou Pearson. L'association entre la radiodensité et la survie, ainsi que la survie sans détérioration clinique fut évaluée à l'aide d'une analyse de régression univariée et multivariée de Cox. Les estimations de survie et de survie sans détérioration clinique furent évaluées à l'aide des courbes de Kaplan-Meier. Le pronostic à long terme des patients atteints d'HTAP avec radiodensité moyenne des artères pulmonaires supérieure et inférieure à la médiane fut comparé à l'aide du test de Log-Rank. La date de la tomodensitométrie fut considérée comme la date de début de suivi. La date de fin de suivi correspond au décès, à la transplantation pulmonaire, ou encore à la fin de l'étude le 20 avril 2017. Les patients perdus de vue ont été censurés à compter de la date de la dernière visite à l'hôpital. Les analyses statistiques furent réalisées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism version 4.0 et du logiciel SAS 9.3 (SAS Institute). Tous les tests statistiques étaient bilatéraux et une valeur de  $p < 0,05$  fut considérée comme statistiquement significative.

### 3.2.6 Résultats

#### 3.2.6.1 *Population à l'étude*

Le Tableau 8 présente les caractéristiques démographiques et cliniques de la population à l'étude. Au total, 84 patients atteints d'HTAP ont été inclus dans notre étude, dont 32 atteints d'HTAP idiopathique ou familiale et 31 de HAP-SSc. En outre, 21 avaient une MVOP hautement probable ou confirmée, et 8 de ces patients étaient atteints de sclérodermie. Parmi les patients atteints d'HTAP, le traitement initial comprenait un antagoniste des récepteurs de l'endothéline ( $n = 21$ ), des inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 ( $n = 37$ ), des analogues de la prostacycline ( $n = 7$ ), ou un traitement d'association ( $N = 10$ ). 9 autres patients avaient des traitements autres ou inconnus. Les patients atteints d'HTAP et les témoins étaient bien appariés.

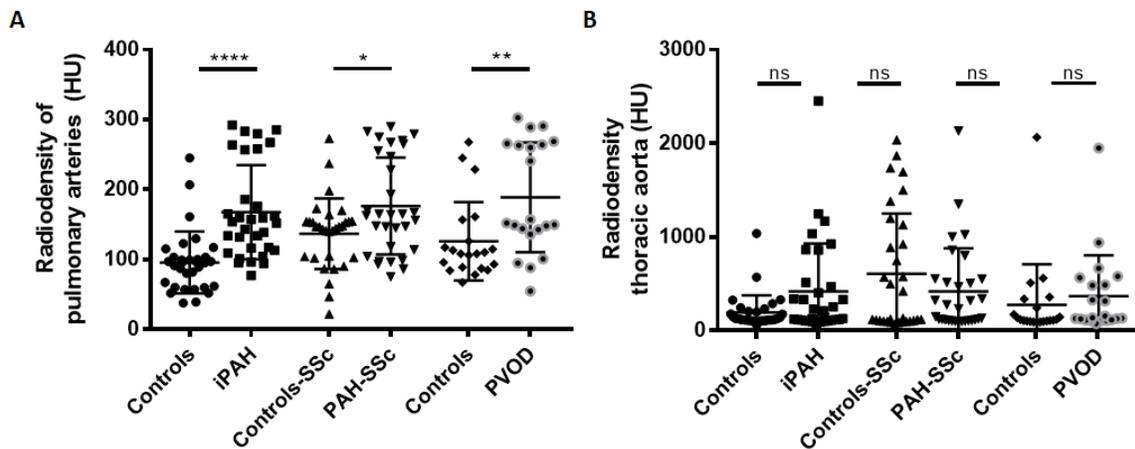
**Tableau 8 : Caractéristiques des patients étudiés.**

*BMI : body mass index; CI: cardiac index; HR: heart rate; iPAH: idiopathic pulmonary arterial hypertension; mPAP: mean pulmonary artery pressure; PAH: pulmonary arterial hypertension; PDE5: phosphodiesterase type 5; PVOD: pulmonary veno-occlusive disease; PVR: pulmonary vascular resistance; SSc: systemic sclerosis; SVO<sub>2</sub>: mixed venous oxygen saturation; WHO: world health organization; 6MWD: 6-minute walking distance.*

Demographics	Controls	PAH				p value between all controls and PAH
		iPAH	PAH-SSc	PVOD	All	
No. of patients	84	32	31	21	84	
Systemic sclerosis, n	39	-	31	8	39	
Age (years)	63±11	62±13	65±9	63±9	63±11	0.67
Female, n (%)	56 (67)	17 (53)	26 (84)	13 (62)	56 (67)	
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	28±6	30±8	27±5	29±6	28±7	0.34
WHO functional class, n (%)						
I	-	1 (3)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	
II	-	5 (16)	5 (16)	2 (10)	12 (14)	
III	-	18 (56)	17 (55)	12 (57)	47 (56)	
IV	-	8 (25)	6 (19)	7 (33)	21 (25)	
Unknown	-	0 (0)	3 (10)	0 (0)	3 (4)	
6MWD (m)	-	321±153	295±103	290±125	304±120	
Hemodynamics						
mPAP (mmHg)	-	44±12	40±12	48±14	44±13	
PVR (dyn. s/cm <sup>5</sup> )	-	683±297	632±443	785±445	690±391	
SVO <sub>2</sub> (%)	-	65±10	65±14	58±10	64±11	
CI (L/min/m <sup>2</sup> )	-	2.47±0.56	2.73±0.76	2.45±0.64	2.56±0.67	
HR (bpm)	-	79±14	82±15	82±15	81±15	
PAH therapy, n (%)						
Endothelin receptor antagonist	-	9 (28)	8 (26)	4 (19)	21 (25)	
PDE5 inhibitor	-	15 (47)	12 (39)	10 (48)	37 (44)	
Prostacyclin analog	-	2 (6)	3 (10)	2 (10)	7 (8)	
Combination therapy	-	6 (19)	4 (13)	0 (0)	10 (12)	
Other/unknown	-	0 (0)	4 (13)	5 (24)	9 (11)	
Hemoglobin (g/L)	125.1±19.3	134.8±20.7	116.3±15.4	133.0±24.2	127.7±21.5	0.72
eGFR (mL/min)	76.10±23.12	65.72±24.69	56.82±24.19	60.75±13.90	61.36±22.38	0.0002

### 3.2.6.2 Mesures tomodensitométriques et corrélations cliniques

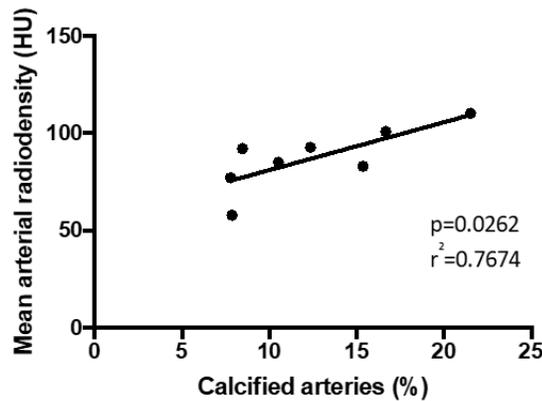
La radiodensité maximale de la paroi vasculaire chez les patients avec HTAP et les témoins est présentée à la Figure 40A. La radiodensité des artères pulmonaires était significativement plus élevée chez les patients atteints d'HTAP que chez les témoins ( $176 \pm 71$  vs.  $118 \pm 52$  HU,  $P < 0,0001$ ), ainsi que dans chaque sous-groupe. Notamment, les patients atteints de PAH-SSc (HTAP associée à la sclérodermie) et de PVOD-SSc (MVOP avec sclérodermie) présentaient une atténuation maximale de la paroi des artères pulmonaires significativement supérieure à celle des autres groupes d'HTAP ( $p = 0,0104$ ). Inversement, la radiodensité maximale de la paroi de l'aorte thoracique descendante était comparable entre les patients atteints d'HTAP et les témoins ( $406 \pm 51$  vs.  $367 \pm 54$  HU,  $p = 0,60$ ) (Figure 40B).



**Figure 40 : Valeurs de radiodensité des artères pulmonaires et de l'aorte selon les groupes d'HTAP.**

A : valeurs de radiodensité maximales moyennes des artères pulmonaires en fonction du type de patient; B : valeurs de radiodensité maximales moyennes de l'aorte thoracique en fonction du type de patient. iPAH : patients ayant une HTAP idiopathique; Controls-SSc : patients ayant une sclérodermie sans HTAP associée; PAH-SSc : patient ayant une HTAP associée à une sclérodermie; PVOD : patients souffrant de maladie veino-occlusive pulmonaire.  $P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$ ,  $****P < 0,0001$ ; ns : non significatif.

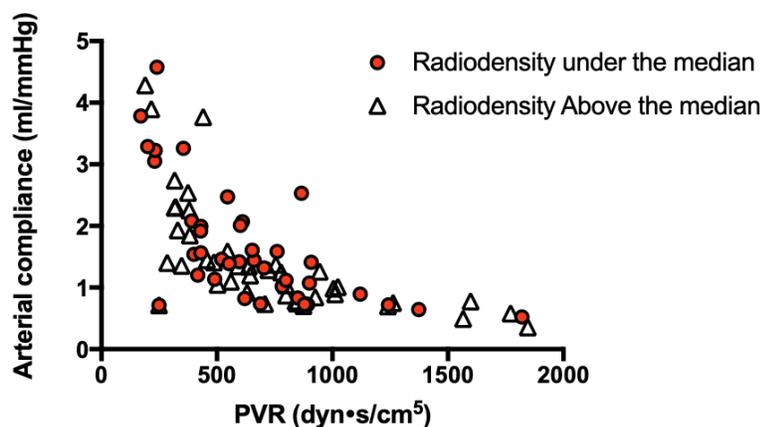
Nos analyses de validation chez une cohorte de 8 patients ont suggéré que la radiodensité accrue était corrélée avec l'augmentation de la calcification observée *in situ* ( $R^2 = 0,7674$ ,  $p = 0,0262$ ) (Figure 41) tel que décrit précédemment.



**Figure 41 : Corrélation entre la radiodensité mesurée et le pourcentage de calcification observé *in situ*.**

Chez les patients atteints d'HTAP, la radiodensité des artères pulmonaires n'était pas corrélée avec l'âge ( $r = 0,056$ ,  $p = 0,614$ ), la durée des symptômes ( $r = 0,325$ ,  $p = 0,140$ ), le périmètre de marche ( $r = -0,065$ ,  $p = 0,447$ ), l'index cardiaque ( $r = -0,048$ ,  $p = 0,652$ ), la pression de l'oreillette droite ( $r = 0,044$ ,  $p = 0,721$ ), la pression moyenne de l'artère pulmonaire ( $r = 0,214$ ,  $p = 0,050$ ), ou encore avec la compliance estimée ( $r = -0,167$ ,  $p = 0,136$ ). Toutefois, la radiodensité des artères pulmonaires corrélait faiblement avec la résistance vasculaire pulmonaire ( $r = 0,239$ ,  $p = 0,033$ ) et avec la radiodensité maximale aortique ( $r = 0,316$ ,  $p = 0,003$ ). La radiodensité maximale de la paroi aortique corrélait avec l'âge des patients atteints d'HTAP ( $r = 0,437$ ,  $p < 0,0001$ ) et des patients contrôles ( $r = 0,449$ ,  $P < 0,0001$ ).

De plus, aucune différence dans les relations compliance-résistance ne fut notée entre les patients atteints d'HTAP lorsqu'ils ont été dichotomisés pour une radiodensité supérieure ou inférieure à la médiane (156,5 UH) (Figure 42).



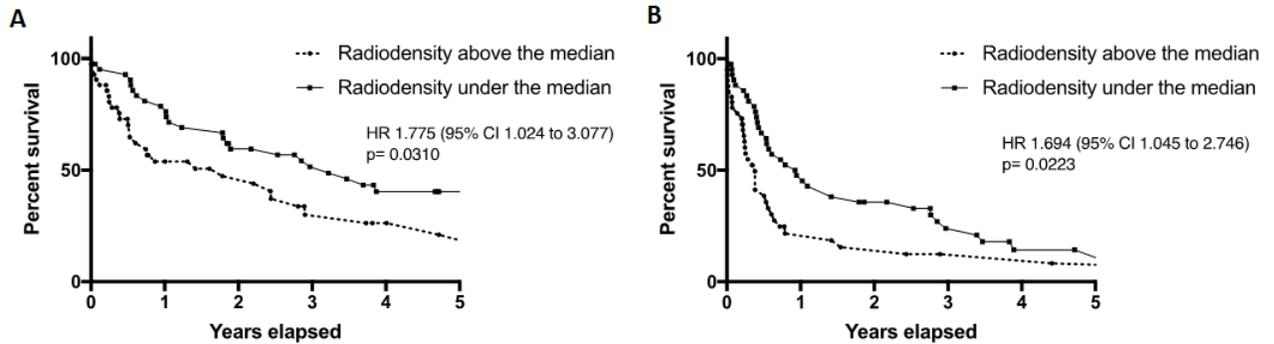
**Figure 42 : Courbes compliance/résistance des patients atteints d'HTAP selon la radiodensité maximale moyenne mesurée.**

*PVR : résistance vasculaire pulmonaire (pulmonary vascular resistance).*

### 3.2.6.3 Réponse initiale au traitement et suivi à long terme

Chez les patients atteints d'HTAP initialement traités avec une thérapie spécifique de l'HTAP, la radiodensité moyenne des artères pulmonaires n'était pas corrélée à des modifications du périmètre au test de marche de 6 minutes ( $r = -0,218$ ,  $p = 0,1107$ ), de la pression moyenne de l'artère pulmonaire ( $r = -0,218$ ,  $p = 0,1701$ ), du débit cardiaque ( $r = -0,315$ ,  $p = 0,0504$ ) ou de la résistance vasculaire pulmonaire ( $r = -0,100$ ,  $p = 0,5512$ ). Au cours d'un suivi moyen de  $32 \pm 33$  mois, 54 patients (64%) sont décédés ou ont été transplantés, et 73 patients (87%) ont présenté une détérioration clinique résultant en des taux de survie et des taux de survie sans détérioration clinique à 1, 3 et 5 ans de 64,1%, 37,5% et 22,7%, et 33,8%, 14,5% et 6,8%, respectivement. Les causes de décès étaient une insuffisance cardiaque droite progressive ( $n = 41$ ), une mort subite ( $n = 7$ ), des complications liées à la sclérodémie ( $n = 1$ ) et d'autres causes ou inconnues ( $n = 5$ ). Cinq patients furent transplantés.

L'analyse univariée a démontré que la radiodensité moyenne des artères pulmonaires corrélait avec la mortalité (rapport de risque [HR], 1.06 par 10 UH; intervalle de confiance à 95% [CI], 1.02–1.10;  $p = 0.002$ ). Par ailleurs, tel qu'attendu, les marqueurs traditionnels de sévérité d'HTAP et le type d'HTAP corrélaient individuellement avec la survie et la survie sans détérioration clinique. L'analyse multivariée a démontré que seulement la radiodensité des artères pulmonaires (HR, 1.07 par 10 UH; 95%CI, 1.03–1.13;  $p = 0.002$ ) et le périmètre de marche au test de 6 minutes (HR, 0.994/m; 95% CI, 0.991–0.997;  $p < 0.001$ ) prédisaient de manière indépendante la survie à long terme. La Figure 43 démontre les courbes de survie de Kaplan-Meier pour les patients atteints d'HTAP, dichotomisées pour la radiodensité des artères pulmonaires supérieure et inférieure à la médiane.



**Figure 43 : Courbes de survie des patients atteints d'HTAP en fonction de la radiodensité maximale moyenne mesurée.**

*A : courbe de survie des patients ayant une radiodensité supérieure ou inférieure à la médiane; B : courbe de survie sans détérioration clinique des patients ayant une radiodensité supérieure ou inférieure à la médiane.*

### 3.2.7 Discussion

Cette étude a démontré qu'en plus d'une dilatation de l'artère pulmonaire et d'une raréfaction des vaisseaux pulmonaires distaux « vascular pruning », l'HTAP est également caractérisée par une radiodensité accrue de la paroi des artères pulmonaires distales observées à la tomодensitométrie sans contraste. De plus, une radiodensité accrue des artères pulmonaires fut observée dans tous les sous-types d'HTAP et cette observation fut limitée aux vaisseaux pulmonaires seulement, les patients avec HTAP ayant des radiodensités maximales de la paroi aortique comparables aux témoins. Bien que la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires ne corrèle pas avec les marqueurs traditionnels de sévérité de l'HTAP, ni avec la réponse initiale au traitement, elle corrèle avec les issues de survie à long terme. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour valider ces résultats et comprendre comment évolue la radiodensité des artères pulmonaires dans le temps et les mécanismes sous-jacents.

La calcification vasculaire, résultant d'un processus d'ossification *in situ*, fut reconnue dès le 19<sup>e</sup> siècle<sup>255</sup>. La calcification artérielle systémique a ensuite été utilisée comme marqueur d'athérosclérose et de remodelage vasculaire. Sans surprises, la calcification vasculaire fut identifiée comme facteur de risque d'événements cardiovasculaires. L'avènement de la tomодensitométrie a permis une évaluation objective des calcifications coronariennes et des gros vaisseaux, généralement quantifiée à l'aide de la méthode initialement décrite en 1990 par Agatston *et al.*<sup>239</sup>. Le score d'Agatston est une mesure composite prenant en compte la superficie et la densité des lésions coronariennes présentant une radiodensité supérieure 130 unités Hounsfield, une valeur seuil considérée comme anormale. Depuis, la tomодensitométrie sans contraste fut progressivement reconnue comme une méthode fiable pour évaluer le fardeau de la plaque athérosclérotique et de la calcification<sup>239</sup>, fournissant ainsi des informations pronostiques supplémentaires, l'athérosclérose constituant un facteur de

risque indépendant d'évènements coronariens, d'insuffisance cardiaque et de mortalité<sup>238,240-244,246</sup>. Cependant, bien que la calcification vasculaire soit un marqueur du remodelage coronarien, la relation avec le taux d'évènements aigus n'est pas bien établie. Le type de plaque et de calcification pourrait possiblement identifier de manière plus fiable les plaques présentant un risque plus élevé de rupture<sup>245,256,257</sup>.

La calcification vasculaire est un processus actif induit par les cellules résultant de la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires en cellules ressemblant à des ostéoblastes en réponse à plusieurs stimuli environnementaux, notamment les dommages à l'ADN, l'inflammation, le stress au niveau du réticulum endoplasmique ou le stress oxydatif<sup>165,183</sup>. Dans les vaisseaux systémiques, cette différenciation cellulaire est associée à la régulation à la baisse du microARN 204, à la régulation à la hausse du facteur de transcription 2 lié à Runt (RUNX2) et à l'activation de protéines favorisant la calcification<sup>235-237</sup>. De façon intéressante, ces voies de signalisation connues pour faciliter la calcification vasculaire sont également impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP<sup>221,223,225,228,258</sup>. Bien que des calcifications macroscopiques évidentes au sein des artères pulmonaires ne soient que rarement observées à la tomodensitométrie de patients atteints d'HTAP<sup>250</sup>, des évidences récentes suggèrent que des processus procalcifiants dans la média des artères pulmonaires distales seraient retrouvées chez les patients atteints d'HTAP idiopathique, de HTAP-SSc et de MVOP<sup>102</sup>. En effet, Ruffenach *et al.* ont mis en évidence une régulation à la hausse de RUNX2, un facteur de transcription susceptible de jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HTAP et de favoriser le développement de lésions calcifiées au sein des artères pulmonaires distales. Par ailleurs, d'autres études ont déjà mis en relief que de nombreuses protéines impliquées dans l'homéostasie osseuse étaient exprimées de manière aberrante dans les poumons de patients avec HTAP, notamment les marqueurs ostéogéniques ostéopontine, ostéocalcine et le collagène de type 1<sup>259</sup>.

Dans les vaisseaux systémiques, les premiers signes histologiques de calcification sont des foyers microscopiques (de 0,5 à 15  $\mu$ m), qui vont ultimement s'agréger<sup>260</sup>. Ces microcalcifications ne sont généralement pas détectées sur les tomodensitométries, étant de volume inférieur à la résolution spatiale, un déterminant important de la qualité de l'image et qui est défini par la taille d'un voxel<sup>261</sup>. Par conséquent, une calcification doit de façon générale atteindre un diamètre > 0,2 mm pour en avoir une bonne visualisation à la tomodensitométrie<sup>251</sup>, et ce, particulièrement au niveau des artères coronaires où les effets d'artefacts de dispersion et de mouvement cardiaque limitent sa précision. De plus, seules les lésions coronariennes avec un coefficient d'atténuation supérieur à 130 unités Hounsfield sont considérées comme anormales, indiquant un processus de calcification. Dans notre étude, malgré l'absence de microcalcifications visibles à la tomodensitométrie, la radiodensité des artères pulmonaires moyenne était supérieure à 165 unités Hounsfield dans tous les sous-groupes d'HTAP et cette valeur corrélait aux microcalcifications in situ dans notre cohorte de validation, corroborant l'hypothèse selon laquelle des processus de procalcifications pourraient être présents

au moment du diagnostic d'HTAP. Par ailleurs, il est important de noter que même si nous croyons que l'augmentation de la radiodensité observée au niveau des artères segmentaires et sous-segmentaires (environ 500-1000  $\mu\text{m}$  de diamètre) peut refléter la sévérité de la maladie en aval, dans les artéioles (environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre), celles-ci n'ont pas été évaluées directement, car elles sont non-visibles à la tomодensitométrie.

Contrairement à certaines données publiées<sup>102</sup>, nous avons observé une radiodensité plus importante des artères pulmonaires chez les patients avec PAH-SSc comparé aux patients avec HTAP idiopathiques et MVOP. Cela pourrait être lié au fait que la sclérodémie est en soi un facteur de risque indépendant pour la calcification vasculaire systémique<sup>262</sup>. L'explication physiopathologique qui sous-tend l'association entre la radiodensité et le pronostic plus sombre pour les patients avec HTAP-SSc demeure incertaine. De plus, les patients atteints d'HTAP et les témoins présentaient des taux d'hémoglobine, d'hématocrite et de nombre de globules rouges similaires, ce qui suggère que les différences de contenu sanguin n'ont pas influencé la mesure de la radiodensité, effet bien démontré dans la littérature<sup>263,264</sup>. De plus, les patients à l'étude ne prenaient pas de médicaments connus pour favoriser la calcification vasculaire, tels que la warfarine et les glucocorticoïdes. Néanmoins, les taux de filtration glomérulaire estimés étaient inférieurs dans les groupes HTAP par rapport aux contrôles et l'insuffisance rénale est une condition prédisposante à l'artériopathie calcifiante, bien que ce phénomène soit plus fréquent avec l'insuffisance rénale de stade terminal<sup>265</sup>. La radiodensité vasculaire accrue chez les patients HTAP par rapport aux contrôles semblait également être spécifique aux vaisseaux pulmonaires, aucune différence de radiodensité aortique n'ayant été observée entre les 2 groupes. En l'absence de synchronisation cardiaque et protocole d'imagerie dédié, les calcifications des artères coronaires n'ont pas pu être mesurées dans notre cohorte. Cela aurait pu être intéressant étant donné que la coronaropathie pourrait être plus prévalente chez les patients atteints d'HTAP que chez la population générale<sup>266,267</sup>. Par ailleurs, la radiodensité des artères pulmonaires était supérieure chez les patients atteints de MVOP par rapport aux témoins, maladie dans laquelle le remodelage vasculaire prédomine généralement au niveau des veines pulmonaires<sup>268</sup>. Toutefois, il est important de noter que le remodelage artériel et les processus procalcifiants<sup>102,269</sup> ont déjà été documentés dans les artères pulmonaires des patients atteints de MVOP, ce qui explique probablement les résultats actuels. En outre, les 8 patients atteints de MVOP avec sclérodémie ont contribué également à ces résultats.

De façon similaire aux événements cardiovasculaires, la radiodensité de la paroi des artères pulmonaires était associée à un risque accru de détérioration clinique et de mortalité chez les patients atteints d'HTAP. Cette association était indépendante du type d'HTAP, des paramètres hémodynamiques pulmonaires et de la réponse initiale au traitement. Une diminution de la compliance des artères pulmonaires est également un marqueur puissant de mauvais pronostic en HTAP idiopathique<sup>233,234</sup>, car elle joue un rôle tout aussi important que la résistance dans la postcharge ventriculaire droite<sup>270</sup>. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une calcification

vasculaire accrue contribuerait à la rigidité des artères pulmonaires en HTAP et aurait une influence sur la relation compliance-résistance de l'artère pulmonaire. Cependant, nos analyses n'ont pas pu confirmer cette hypothèse. L'absence de relation entre la radiodensité des artères pulmonaires et les marqueurs traditionnels de la sévérité de l'HTAP est donc intrigante et difficile à expliquer, en particulier parce que la densité des artères pulmonaires était particulièrement associée à une mortalité précoce. Que cette divergence soit liée au biais de sélection, à l'inclusion de patients présentant un remodelage artériel versus veineux hétérogène ou encore à une puissance statistique limitée demeure incertain et nécessite des études ultérieures. En effet, la nécessité d'une tomодensitométrie haute résolution sans contraste au moment du diagnostic a probablement entraîné un certain biais de sélection, ce qui explique la proportion plus élevée de patients atteints de MVOP et la plus faible survie à long terme par rapport à une cohorte d'HTAP non sélectionnée. Enfin, malgré l'intérêt croissant que suscitent récemment l'évaluation et l'imagerie non invasives des HTAP, la capacité de la radiodensité des artères pulmonaires à discriminer les patients atteints d'HTAP et les témoins, ainsi que les survivants et les non-survivants demeure limitée.

Notre étude présente plusieurs limites. Premièrement, la faible taille de l'échantillon a possiblement pu empêcher la mise en lumière de l'association entre la radiodensité et la relation compliance-résistance des artères pulmonaires. Deuxièmement, malgré la relation documentée à la tomодensitométrie entre la radiodensité et la teneur en calcium vasculaire<sup>251</sup> et les résultats histologiques de notre cohorte de validation, d'autres variables ont pu influencer sur la radiodensité des parois des artères pulmonaires<sup>263</sup>, y compris les erreurs d'échantillonnage, ainsi que l'insuffisance rénale plus importante chez les patients HTAP/MVOP que chez les témoins. Il reste donc à confirmer si l'augmentation de la radiodensité des parois des artères pulmonaires est vraiment représentative des processus de procalcification dans celles-ci. Troisièmement, les patients atteints d'HTAP présentent souvent des symptômes pendant des mois et même des années avant que le diagnostic ne soit posé<sup>50</sup>. Et donc, bien que les tomодensitométries analysées soient celles effectuées au moment du diagnostic, il est impossible d'avancer que l'augmentation de radiodensité des artères pulmonaires est un phénomène précoce en HTAP. Quatrièmement, les patients furent traités conformément aux lignes directrices actuelles, mais le caractère rétrospectif de l'étude empêche évidemment de contrôler la prise en charge thérapeutique des patients et peut-être que les différents traitements de l'HTAP ont pu avoir une influence sur nos résultats. Enfin, nous avons analysé de manière rétrospective des images tomодensitométriques préexistantes avec des paramètres d'acquisition légèrement différents. La validation de ces résultats dans une étude prospective avec des protocoles d'imagerie standardisés est donc suggérée.

En conclusion, la radiodensité des parois des artères pulmonaires à la tomодensitométrie sans contraste est significativement augmentée chez les patients HTAP, HTAP-SSc et MVOP par rapport aux témoins, ce qui suggère que des processus de remodelage procalcifiants pourraient être en cours au moment du diagnostic.

De manière similaire aux études précédentes sur des vaisseaux systémiques, une radiodensité accrue de la paroi des artères pulmonaires était associée à une survie inférieure. Les mécanismes qui expliquent l'augmentation de la radiodensité des artères pulmonaires et sa valeur pronostique en HTAP restent à élucider. Des travaux supplémentaires sont donc nécessaires pour valider ces résultats et déterminer si une imagerie non invasive pourrait aider à stratifier les patients et à orienter la prise en charge initiale de la maladie.

## Conclusion

L'HTAP est maladie rare et incurable caractérisée par un remodelage excessif du lit vasculaire pulmonaire. Ce remodelage contribue à l'augmentation de la résistance et de l'impédance vasculaire qui résultent en une surcharge du ventricule droit, puis à sa dysfonction et ultimement au décès du patient. Les mécanismes moléculaires et cellulaires physiopathologiques sont complexes, multifactoriels et encore mal connus. Parmi les facteurs environnementaux décrits dans la pathogenèse de l'HTAP, certains facteurs ont été liés au développement d'autres pathologies cardiovasculaires faisant intervenir des mécanismes de biominéralisation. Ceux-ci sont impliqués dans une perte de la compliance vasculaire et deviennent ainsi des facteurs de mauvais pronostic pour les patients. Au cours de ma maîtrise en sciences cliniques et biomédicales, j'ai été amenée à travailler au sein du groupe de recherche en hypertension artérielle pulmonaire des professeurs Provencher et Bonnet. Durant ma formation, notre équipe a mis en lumière la présence de microcalcifications au niveau des petites artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP. Au cours de cette étude, nous avons décrit une nouvelle voie de signalisation impliquée dans le développement de la maladie passant par l'activation anormale du facteur de transcription Runx2. La surexpression de ce facteur au sein des cellules musculaires lisses active la voie HIF-1 $\alpha$ , un acteur clé dans l'acquisition du phénotype proliférant et résistant à l'apoptose impliqué dans le remodelage vasculaire. L'utilisation de cette voie de signalisation pourrait devenir une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de l'HTAP humaine. En effet, son blocage au niveau pulmonaire a permis d'améliorer grandement les paramètres hémodynamiques ainsi que le remodelage vasculaire de rats dans le modèle d'HTAP expérimental utilisant le Sugén et l'hypoxie.

L'expression du facteur de transcription Runx2 est également responsable d'une transdifférenciation des cellules musculaires lisses vers un phénotype pseudo-ostéogénique. Ce mécanisme a été décrit dans diverses pathologies aboutissant à des calcifications vasculaires mesurables par tomodensitométrie sur des vaisseaux de plus gros calibre tels que l'aorte et les artères coronaires. La mesure de celles-ci a une valeur pronostique établie pour les maladies cardiovasculaires. De telles augmentations de radiodensité pourraient servir dans le cas de l'HTAP. Dans le cadre de ma maîtrise, nous avons donc analysé de façon rétrospective la radiodensité des artères pulmonaires proximales de 84 patients atteints d'HTAP et de leurs contrôles. Nous avons mis en évidence une augmentation de la radiodensité maximale de la paroi des artères pulmonaires des patients avec HTAP (autant idiopathiques, associés à la sclérodermie ou encore à la maladie veino-occlusive pulmonaire) par rapport aux patients sains. Chez les patients atteints d'HTAP, cette augmentation de la radiodensité corrèle avec un pronostic plus sombre expliqué par un taux de mortalité et de mortalité sans détérioration clinique plus important. Cette relation est indépendante des marqueurs de sévérité usuels en HTAP, la radiodensité n'étant corrélée à aucun d'eux. Cette étude nous a donc permis de décrire un potentiel nouveau marqueur pronostique

en HTAP. Nous avons également démontré que cette mesure de radiodensité était une technique fiable et reproductible grâce à des analyses de coefficient de corrélation intraexamineur et de Bland-Altman. À terme, l'utilisation de notre méthode d'évaluation de la radiodensité à la tomодensitométrie pourrait donner lieu à un nouveau critère pronostique facilement accessible puisque cette modalité d'imagerie est déjà nécessaire à la prise en charge et au diagnostic des patients atteints d'HTAP. Une investigation sur une cohorte plus nombreuse et multicentrique avec des paramètres d'acquisition tomодensitométriques standardisés sera nécessaire pour confirmer nos résultats.

Au cours de ma maîtrise, j'ai ainsi pu aborder différents aspects de la recherche médicale. Par ma contribution au projet ayant identifié la voie RUNX2/HIF-1 $\alpha$  dans la physiopathologie de l'HTAP, j'ai pu avoir une exposition à la recherche fondamentale. Mon travail sur les lésions radiodenses, quant à lui, m'a permis de développer et de mener à terme un projet de recherche clinique. Ces deux projets ont donné lieu à des publications dans *l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*<sup>102,232</sup>. En plus de ces deux aspects de la recherche translationnelle, j'ai également travaillé sur 2 méta-analyses, l'une portant sur les anticoagulants oraux directs comparés à l'héparine de bas poids moléculaire dans le traitement des thromboembolies veineuses reliées au cancer, et l'autre sur les effets des corticostéroïdes inhalés sur la dyspnée, la qualité de vie et la tolérance à l'effort dans le cas d'une maladie pulmonaire obstructive chronique, toutes 2 non présentées dans ce mémoire. J'ai également contribué à une revue de littérature sur les mécanismes moléculaires de l'HTAP, encore une fois non présentée dans ce mémoire. Ces différentes expériences m'ont permis de participer à tous les aspects de la recherche médicale, du fondamental à l'appliqué.

# Bibliographie

1. Pulmonary circulation | physiology [Internet]. Encyclopedia Britannica. [cited 2019 Jul 11]; Available from: <https://www.britannica.com/science/pulmonary-circulation>
2. Boyette LC, Burns B. Physiology, Pulmonary Circulation [Internet]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cited 2019 Jul 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518997/>
3. Levitzky MG. Blood Flow to the Lung. In: Pulmonary Physiology. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
4. Charan NB, Thompson WH, Carvalho P. Functional anatomy of bronchial veins. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20:100–103.
5. Fremgen BF, Frucht SS. Chapter 5: Cardiovascular System [Internet]. In: Medical Terminology: A Living Language. Pearson Education, Inc; 2019. p. 145–184. Available from: <https://www.pearsonhighered.com/assets/samplechapter/0/1/3/4/0134701208.pdf>
6. Murillo H, Cutalo MJ, Jones RP, Lane MJ, Fleischmann D, Restrepo CS. Pulmonary circulation imaging: embryology and normal anatomy. *Semin Ultrasound CT MR.* 2012;33:473–484.
7. Suresh K, Shimoda L. Lung circulation. *Comprehensive Physiology.* 2016;6:897–943.
8. Culver BH, Glenny RW. Chapter 4 - Pulmonary Circulation. In: Spiro SG, Silvestri GA, Agustí A, editors. Clinical Respiratory Medicine (Fourth Edition). Philadelphia: W.B. Saunders; 2012. p. 29–36.
9. Douglas College. Chapter 20. The Cardiovascular System: Blood Vessels and Circulation [Internet]. In: Douglas College Human Anatomy and Physiology I. New Westminster BC: Douglas College; 2017. p. 464–503. Available from: <https://pressbooks.bccampus.ca/dcbiol11031109/>
10. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Reckelhoff JF. Introduction to Pulmonary Structure & Mechanics. In: Ganong's Medical Physiology Examination & Board Review. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2017.
11. Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physiol.* 2012;2:675–709.
12. Young DB. Control of Cardiac Output [Internet]. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [cited 2019 Aug 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54473/>
13. Chamarthy MR, Kandathil A, Kalva SP. Pulmonary vascular pathophysiology. *Cardiovasc Diagn Ther.* 2018;8:208–213.
14. Chemla D, Lau EMT, Attal P, Hervé P. Circulation pulmonaire normale et au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire. *La Lettre du Cardiologue.* 2015;7.
15. Naderi N. Chapter 11 - Hemodynamic Study [Internet]. In: Maleki M, Alizadehasl A, Haghjoo M, editors. Practical Cardiology. Elsevier; 2018 [cited 2019 Jul 11]. p. 183–191. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323511490000110>

16. Lewis GD, Bossone E, Naeije R, Grünig E, Saggari R, Lancellotti P, Ghio S, Varga J, Rajagopalan S, Oudiz R, Rubenfire M. Pulmonary vascular hemodynamic response to exercise in cardiopulmonary diseases. *Circulation*. 2013;128:1470–1479.
17. NAEIJE R, CHESLER N. PULMONARY CIRCULATION AT EXERCISE. *Compr Physiol*. 2012;2:711–741.
18. Chemla D, Lau EMT, Papelier Y, Attal P, Hervé P. Pulmonary vascular resistance and compliance relationship in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2015;46:1178–1189.
19. Sudini NL, Denault AY, Rudski L, VonkNordengraff A, Fadel E, Mercier O, Huo J, Guihaire J, Kudelko K, Zamanian R, Haddad F. The Relationship of Pulmonary Vascular Resistance and Pulmonary Arterial Compliance with Right Ventricular Function in Pulmonary Arterial Hypertension. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2013;32:S63–S64.
20. Saouti N, Westerhof N, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. The arterial load in pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev*. 2010;19:197–203.
21. Ghio S, Schirinzi S, Pica S. Pulmonary arterial compliance: How and why should we measure it? *Glob Cardiol Sci Pract* [Internet]. 2015 [cited 2019 Sep 24];2015. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4710864/>
22. Naeije R. coeur droit et circulation pulmonaire. In: *Traité de pneumologie - 2e ed. Médecine -Science*, Flammarion; 2009. p. 60–68.
23. Vlachopoulos C, O'Rourke M, Nichols WW. *McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. CRC Press; 2011.
24. Attinger EO, Anné A, McDonald DA. Use of Fourier series for the analysis of biological systems. *Biophys J*. 1966;6:291–304.
25. Chesler NC, Roldan A, Vanderpool RR, Naeije R. How to Measure Pulmonary Vascular and Right Ventricular Function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009;2009:177–180.
26. Smith SW. *The Scientist & Engineer's Guide to Digital Signal Processing*. 1st edition. San Diego, Calif: California Technical Pub; 1997.
27. Stade E. *Fourier Analysis*. John Wiley & Sons; 2011.
28. Fourier Analysis and its Role in Hearing Aids | Wayne Staab, PhD | [hearinghealthmatters.org/waynesworld/](http://hearinghealthmatters.org/waynesworld/) [Internet]. Wayne's World. 2012 [cited 2019 Oct 22]; Available from: <https://hearinghealthmatters.org/waynesworld/2012/fourier-analysis-and-its-role-in-hearing-aids/>
29. Pierce R. Fourier Series [Internet]. Math Is Fun. [cited 2019 Oct 24]; Available from: <https://www.mathsisfun.com/calculus/fourier-series.html>
30. Huez S, Brimiouille S, Naeije R, Vachiéry J-L. Feasibility of routine pulmonary arterial impedance measurements in pulmonary hypertension. *Chest*. 2004;125:2121–2128.
31. Cheung Y. Systemic circulation. In: *Paediatric Cardiology*. Elsevier Health Sciences; 2009. p. 91–116.
32. Tedford RJ. Determinants of right ventricular afterload (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ*. 2014;4:211–219.

33. Milnor WR, Conti CR, Lewis KB, O'Rourke MF. Pulmonary arterial pulse wave velocity and impedance in man. *Circ Res.* 1969;25:637–649.
34. Wang Z, Chesler NC. Pulmonary vascular wall stiffness: An important contributor to the increased right ventricular afterload with pulmonary hypertension. *Pulm Circ.* 2011;1:212–223.
35. Weinberg Craig E., Hertzberg Jean R., Ivy D, Dunbar, Kirby K. Scott, Chan K. Chen, Valdes-Cruz Lilliam, Shandas Robin. Extraction of Pulmonary Vascular Compliance, Pulmonary Vascular Resistance, and Right Ventricular Work From Single-Pressure and Doppler Flow Measurements in Children With Pulmonary Hypertension: a New Method for Evaluating Reactivity. *Circulation.* 2004;110:2609–2617.
36. West JB, Dollery CT, Naimark A. DISTRIBUTION OF BLOOD FLOW IN ISOLATED LUNG; RELATION TO VASCULAR AND ALVEOLAR PRESSURES. *J Appl Physiol.* 1964;19:713–724.
37. Boron W, Boulpaep E. Perfusion of the Lung [Internet]. In: Medical Physiology. Elsevier; 2016. p. 1312. Available from: <https://www.elsevier.com/books/medical-physiology/boron/978-1-4557-4377-3>
38. Croft QPP, Formenti F, Talbot NP, Lunn D, Robbins PA, Dorrington KL. Variations in Alveolar Partial Pressure for Carbon Dioxide and Oxygen Have Additive Not Synergistic Acute Effects on Human Pulmonary Vasoconstriction. *PLOS ONE.* 2013;8:e67886.
39. Balanos GM, Talbot NP, Dorrington KL, Robbins PA. Human pulmonary vascular response to 4 h of hypercapnia and hypocapnia measured using Doppler echocardiography. *Journal of Applied Physiology.* 2003;94:1543–1551.
40. Lumb AB, Slinger P. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications. *Anesthesiology.* 2015;122:932–946.
41. Archer S, Michelakis E. The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O(2) sensors, and controversies. *News Physiol Sci.* 2002;17:131–137.
42. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris).* 2011;27:405–412.
43. Dunham-Snary KJ, Wu D, Sykes EA, Thakrar A, Parlow LRG, Mewburn JD, Parlow JL, Archer SL. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: From Molecular Mechanisms to Medicine. *Chest.* 2017;151:181–192.
44. Sommer N, Strielkov I, Pak O, Weissmann N. Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Eur Respir J.* 2016;47:288–303.
45. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J.* 2008;32:1639–1651.
46. Ketabchi F, Egemnazarov B, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Shid-Moosavi M, Dehghani GA, Weissmann N, Sommer N. Effects of hypercapnia with and without acidosis on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2009;297:L977–L983.
47. Loeppky JA, Scotto P, Riedel CE, Roach RC, Chick TW. Effects of acid-base status on acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and gas exchange. *J Appl Physiol.* 1992;72:1787–1797.

48. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53.
49. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D34-41.
50. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier J-F, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1023–1030.
51. Thenappan T, Shah SJ, Rich S, Tian L, Archer SL, Gomberg-Maitland M. Survival in pulmonary arterial hypertension: a reappraisal of the NIH risk stratification equation. *Eur Respir J*. 2010;35:1079–1087.
52. Houtchens J, Martin D, Klinger JR. Diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Med*. 2011;2011:845864.
53. Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD. An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest*. 2012;142:448–456.
54. Morrell NW, Aldred MA, Chung WK, Elliott CG, Nichols WC, Soubrier F, Trembath RC, Loyd JE. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 18];53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6351337/>
55. Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EMHF, Roofthoof MTR, Leter EM, Douwes JM, Van Dijk A, Vonk-Noordegraaf A, Dijk-Bos KK, Hoefsloot LH, Hoendermis ES, Gille JJP, Sikkema-Raddatz B, Hofstra RMW, Berger RMF. TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2013;50:500–506.
56. Gräf S, Haimel M, Bleda M, Hadinnapola C, Southgate L, Li W, Hodgson J, Liu B, Salmon RM, Southwood M, Machado RD, Martin JM, Treacy CM, Yates K, Daugherty LC, Shamardina O, Whitehorn D, Holden S, Aldred M, Bogaard HJ, Church C, Coghlan G, Condliffe R, Corris PA, Danesino C, Eyries M, Gall H, Ghio S, Ghofrani H-A, Gibbs JSR, Girerd B, Houweling AC, Howard L, Humbert M, Kiely DG, Kovacs G, MacKenzie Ross RV, Moledina S, Montani D, Newnham M, Olschewski A, Olschewski H, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Prokopenko I, Rhodes CJ, Scelsi L, Seeger W, Soubrier F, Stein DF, Suntharalingam J, Swietlik EM, Toshner MR, van Heel DA, Vonk Noordegraaf A, Waisfisz Q, Wharton J, Wort SJ, Ouwehand WH, Soranzo N, Lawrie A, Upton PD, Wilkins MR, Trembath RC, Morrell NW. Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*. 2018;9:1416.
57. Condon DF, Nickel NP, Anderson R, Mirza S, de Jesus Perez VA. The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new. *F1000Res* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 19];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6584967/>
58. Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jaïs X, Tregouet D, Reis A, Drouin-Garraud V, Fraise A, Sitbon O, O'Callaghan DS, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:851–861.

59. Sitbon O, Humbert M, Simonneau G. Pulmonary hypertension related to appetite suppressants. In: *Pulmonary Circulation: Diseases and Their Treatment*, Third Edition. CRC Press; 2011.
60. Abenheim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Bégaud B. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*. 1996;335:609–616.
61. Souza R, Humbert M, Sztrymf B, Jaïs X, Yaïci A, Le Pavec J, Parent F, Hervé P, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur Respir J*. 2008;31:343–348.
62. Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani H-A. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation*. 2013;127:1128–1138.
63. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1171–1177.
64. Godinas L, Guignabert C, Seferian A, Perros F, Bergot E, Sibille Y, Humbert M, Montani D. Tyrosine kinase inhibitors in pulmonary arterial hypertension: a double-edge sword? *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34:714–724.
65. Weatherald J, Chaumais M-C, Savale L, Jaïs X, Seferian A, Canuet M, Bouvaist H, Magro P, Bergeron A, Guignabert C, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Long-term outcomes of dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension: a population-based study. *Eur Respir J*. 2017;50.
66. Launay D, Sobanski V, Hachulla E, Humbert M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: different phenotypes. *Eur Respir Rev*. 2017;26.
67. Hachulla E, de Groote P, Gressin V, Sibilia J, Diot E, Carpentier P, Mouthon L, Hatron P-Y, Jego P, Allanore Y, Tiev KP, Agard C, Cosnes A, Cirstea D, Constans J, Farge D, Viillard J-F, Harle J-R, Patat F, Imbert B, Kahan A, Cabane J, Clerson P, Guillevin L, Humbert M, Itinér AIR-Sclérodemie Study Group. The three-year incidence of pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in a multicenter nationwide longitudinal study in France. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1831–1839.
68. Petitpretz P, Brenot F, Azarian R, Parent F, Rain B, Herve P, Simonneau G. Pulmonary hypertension in patients with human immunodeficiency virus infection. Comparison with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1994;89:2722–2727.
69. Degano B, Yaïci A, Le Pavec J, Savale L, Jaïs X, Camara B, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Long-term effects of bosentan in patients with HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2009;33:92–98.
70. Le Pavec J, Souza R, Herve P, Lebrec D, Savale L, Tcherakian C, Jaïs X, Yaïci A, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Portopulmonary hypertension: survival and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:637–643.
71. Krowka MJ, Miller DP, Barst RJ, Taichman D, Dweik RA, Badesch DB, McGoon MD. Portopulmonary hypertension: a report from the US-based REVEAL Registry. *Chest*. 2012;141:906–915.

72. Engelfriet PM, Duffels MGJ, Möller T, Boersma E, Tijssen JGP, Thaulow E, Gatzoulis MA, Mulder BJM. Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart*. 2007;93:682–687.
73. Beghetti M. [Pulmonary hypertension associated with congenital heart disease]. *Rev Mal Respir*. 2006;23:13S49-59; quiz 13S157, 13S159.
74. Waddell TK, Bennett L, Kennedy R, Todd TRJ, Keshavjee SH. Heart-lung or lung transplantation for Eisenmenger syndrome. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21:731–737.
75. Frank DB, Hanna BD. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease and Eisenmenger syndrome: current practice in pediatrics. *Minerva Pediatr*. 2015;67:169–185.
76. Butrous G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2019;2019:5.
77. Graham BB, Bandeira AP, Morrell NW, Butrous G, Tuder RM. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*. 2010;137:20S-29S.
78. Graham BB, Kumar R. Schistosomiasis and the pulmonary vasculature (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ*. 2014;4:353–362.
79. WHO | 10 facts about schistosomiasis [Internet]. WHO. [cited 2019 Jul 11];Available from: <http://www.who.int/features/factfiles/schistosomiasis/en/>
80. Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJC, Dourado PMM, Figueiredo M, Farias A, Tsutsui J, Terra-Filho M, Humbert M, Souza R. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation*. 2009;119:1518–1523.
81. Hemnes AR, Zhao M, West J, Newman JH, Rich S, Archer SL, Robbins IM, Blackwell TS, Cogan J, Loyd JE, Zhao Z, Gaskill C, Jetter C, Kropski JA, Majka SM, Austin ED. Critical Genomic Networks and Vasoreactive Variants in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:464–475.
82. Hemnes AR, Trammell AW, Archer SL, Rich S, Yu C, Nian H, Penner N, Funke M, Wheeler L, Robbins IM, Austin ED, Newman JH, West J. Peripheral blood signature of vasodilator-responsive pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2015;131:401–409; discussion 409.
83. Lantuéjoul S, Sheppard MN, Corrin B, Burke MM, Nicholson AG. Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: a clinicopathologic study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:850–857.
84. Montani D, O'Callaghan DS, Savale L, Jaïs X, Yaïci A, Maitre S, Dorfmueller P, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease: recent progress and current challenges. *Respir Med*. 2010;104 Suppl 1:S23-32.
85. Montani D, Achouh L, Dorfmueller P, Le Pavec J, Sztrymf B, Tchérakian C, Rabiller A, Haque R, Sitbon O, Jaïs X, Dartevelle P, Maitre S, Capron F, Musset D, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease: clinical, functional, radiologic, and hemodynamic characteristics and outcome of 24 cases confirmed by histology. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87:220–233.

86. Montani D, Girerd B, Jaïs X, Levy M, Amar D, Savale L, Dorfmüller P, Seferian A, Lau EM, Eyries M, Le Pavec J, Parent F, Bonnet D, Soubrier F, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary veno-occlusive disease: a population-based study. *Lancet Respir Med.* 2017;5:125–134.
87. Salzman D, Adkins DR, Craig F, Freytes C, LeMaistre CF. Malignancy-associated pulmonary veno-occlusive disease: report of a case following autologous bone marrow transplantation and review. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18:755–760.
88. Kuga T, Kohda K, Hirayama Y, Matsumoto S, Nakazawa O, Ando M, Ezoe A, Nobuoka A, Mochizuki C. Pulmonary veno-occlusive disease accompanied by microangiopathic hemolytic anemia 1 year after a second bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 1996;64:143–150.
89. Troussard X, Bernaudin JF, Cordonnier C, Fleury J, Payen D, Briere J, Vernant JP. Pulmonary veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. *Thorax.* 1984;39:956–957.
90. Rose AG. Pulmonary veno-occlusive disease due to bleomycin therapy for lymphoma. Case reports. *S Afr Med J.* 1983;64:636–638.
91. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais M-C, Dorfmüller P, Antigny F, Dumas SJ, Raymond N, Lau E, Savale L, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G, Stenmark K, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Montani D, Perros F. Chemotherapy-induced pulmonary hypertension: role of alkylating agents. *Am J Pathol.* 2015;185:356–371.
92. Perros F, Günther S, Ranchoux B, Godinas L, Antigny F, Chaumais M-C, Dorfmüller P, Hautefort A, Raymond N, Savale L, Jaïs X, Girerd B, Cottin V, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Mitomycin-Induced Pulmonary Venno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation.* 2015;132:834–847.
93. Dumas O, Despreaux T, Perros F, Lau E, Andujar P, Humbert M, Montani D, Descatha A. Respiratory effects of trichloroethylene. *Respir Med.* 2018;134:47–53.
94. Montani D, Lau EM, Descatha A, Jaïs X, Savale L, Andujar P, Bensefa-Colas L, Girerd B, Zendah I, Le Pavec J, Seferian A, Perros F, Dorfmüller P, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2015;46:1721–1731.
95. Fuloria M, Aschner JL. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2017;22:220–226.
96. Bendapudi P, Rao GG, Greenough A. Diagnosis and management of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Paediatr Respir Rev.* 2015;16:157–161.
97. McLaughlin VV, Shah SJ, Souza R, Humbert M. Management of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:1976–1997.
98. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:23–47.

99. Stenmark KR, Frid MG, Yeager M, Li M, Riddle S, McKinsey T, El Kasmi KC. Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. *Pulm Circ.* 2012;2:3–14.
100. Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, Frid M. The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Compr Physiol.* 2011;1:141–161.
101. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2006;113:2630–2641.
102. Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, Courboulain A, Boucherat O, Potus F, Meloche J, Pflieger A, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Tremblay E, Girerd B, Hautefort A, Montani D, Fadel E, Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194:1273–1285.
103. Paulin R, Meloche J, Bonnet S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAKSTAT.* 2012;1:223–233.
104. Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:97.
105. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation.* 2015;131:1006–1018.
106. Good RB, Gilbane AJ, Trinder SL, Denton CP, Coghlan G, Abraham DJ, Holmes AM. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol.* 2015;185:1850–1858.
107. Hopper RK, Moonen J-RAJ, Diebold I, Cao A, Rhodes CJ, Tojais NF, Hennigs JK, Gu M, Wang L, Rabinovitch M. In Pulmonary Arterial Hypertension, Reduced BMPR2 Promotes Endothelial-to-Mesenchymal Transition via HMGA1 and Its Target Slug. *Circulation.* 2016;133:1783–1794.
108. Mammoto T, Muyleart M, Konduri GG, Mammoto A. Twist1 in Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension through Transforming Growth Factor- $\beta$ -Smad Signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58:194–207.
109. Ranchoux B, Harvey LD, Ayon RJ, Babicheva A, Bonnet S, Chan SY, Yuan JX-J, Perez V de J. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: an evolving landscape (2017 Grover Conference Series). *Pulm Circ.* 2018;8:2045893217752912.
110. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Sanchez O, Simonneau G, Müller K-M, Capron F. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol.* 2007;38:893–902.

111. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43:S25–S32.
112. Histopathology images of pulmonary vascular disease: Complex lesions in PH [Internet]. PVRI. [cited 2019 Jul 21]; Available from: <https://pvrinstitute.org/en/professionals/learning/2015/1/1/histopathology-images-of-pulmonary-vascular-disease-complex-lesions-in-ph/>
113. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoepfer MM, Gottlieb J, Nickel N, Hussein K, Maus U, Lehmann U, Janciauskiene S, Welte T, Haverich A, Rische J, Kreipe H, Laenger F. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. *Am J Pathol*. 2011;179:167–179.
114. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res*. 2009;10:95.
115. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tuder RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 1998;101:927–934.
116. Galambos C, Sims-Lucas S, Abman SH, Cool CD. Intrapulmonary Bronchopulmonary Anastomoses and Plexiform Lesions in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:574–576.
117. Histopathology images of pulmonary vascular disease: Arteritis in peripheral pulmonary arteries [Internet]. PVRI. [cited 2019 Jul 21]; Available from: <https://pvrinstitute.org/en/professionals/learning/2015/1/1/histopathology-images-of-pulmonary-vascular-disease-arteritis-in-peripheral-pulmonary-arteries/>
118. Cheever KH. An overview of pulmonary arterial hypertension: risks, pathogenesis, clinical manifestations, and management. *J Cardiovasc Nurs*. 2005;20:108–116; quiz 117–118.
119. Frost A, Badesch D, Gibbs JSR, Gopalan D, Khanna D, Manes A, Oudiz R, Satoh T, Torres F, Torbicki A. Diagnosis of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53.
120. Waxman AB, Loscalzo J. Pulmonary Hypertension [Internet]. In: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018 [cited 2019 Jul 11]. Available from: [accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1155975545](https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1155975545)
121. Aebischer N. Hypertension pulmonaire : difficulté diagnostique et intérêt de l'échocardiographie. *Revue Médicale Suisse*. 2009;5:1210–1213.
122. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ*. 2018;360:j5492.
123. Seferian A, Simonneau G. Hypertension pulmonaire : définition, diagnostic et nouvelle classification. *La Presse Médicale*. 2014;43:935–944.
124. Klabunde RE. CV Physiology | Pulmonary Capillary Wedge Pressure [Internet]. *Cardiovascular Physiology Concepts*. [cited 2019 Jul 21]; Available from: <https://cvphysiology.com/Heart%20Failure/HF008>

125. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J*. 2009;34:888–894.
126. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D42-50.
127. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf AV, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez MAG, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European Respiratory Journal*. 2015;46:903–975.
128. Hinderliter AL, Willis PW, Barst RJ, Rich S, Rubin LJ, Badesch DB, Groves BM, McGoon MD, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Koch G, Li S, Clayton LM, Jöbsis MM, Blackburn SD, Crow JW, Long WA. Effects of long-term infusion of prostacyclin (epoprostenol) on echocardiographic measures of right ventricular structure and function in primary pulmonary hypertension. Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *Circulation*. 1997;95:1479–1486.
129. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, Koerner SK, Langleben D, Keller CA, Murali S, Uretsky BF, Clayton LM, Jöbsis MM, Blackburn SD, Shortino D, Crow JW, Primary Pulmonary Hypertension Study Group. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1996;334:296–301.
130. Simonneau G, Rubin LJ, Galiè N, Barst RJ, Fleming TR, Frost AE, Engel PJ, Kramer MR, Burgess G, Collings L, Cossons N, Sitbon O, Badesch DB, PACES Study Group. Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2008;149:521–530.
131. Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Fujita M, Nakanishi N, Miyatake K. Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:487–492.
132. Cahalin LP, Mathier MA, Semigran MJ, Dec GW, DiSalvo TG. The six-minute walk test predicts peak oxygen uptake and survival in patients with advanced heart failure. *Chest*. 1996;110:325–332.
133. Roul G, Germain P, Bareiss P. Does the 6-minute walk test predict the prognosis in patients with NYHA class II or III chronic heart failure? *Am Heart J*. 1998;136:449–457.
134. Warwick G, Thomas PS, Yates DH. Biomarkers in pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*. 2008;32:503–512.
135. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1628–1631.
136. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory

- cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;122:920–927.
137. Grünig E, Eichstaedt C, Barberà J-A, Benjamin N, Blanco I, Bossone E, Cittadini A, Coghlan G, Corris P, D'Alto M, D'Andrea A, Delcroix M, de Man F, Gaine S, Ghio S, Gibbs S, Gumbiene L, Howard LS, Johnson M, Jurevičienė E, Kiely DG, Kovacs G, MacKenzie A, Marra AM, McCaffrey N, McCaughey P, Naeije R, Olschewski H, Pepke-Zaba J, Reis A, Santos M, Saxer S, Tulloh RM, Ulrich S, Vonk Noordegraaf A, Peacock AJ. ERS statement on exercise training and rehabilitation in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53.
  138. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351:1425–1436.
  139. Galiè N, Channick RN, Frantz RP, Grünig E, Jing ZC, Moiseeva O, Preston IR, Pulido T, Safdar Z, Tamura Y, McLaughlin VV. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2019;53.
  140. Velayati A, Valerio MG, Shen M, Tariq S, Lanier GM, Aronow WS. Update on pulmonary arterial hypertension pharmacotherapy. *Postgrad Med*. 2016;128:460–473.
  141. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111:3105–3111.
  142. Meyers KEC, Sethna C. Endothelin antagonists in hypertension and kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2013;28:711–720.
  143. Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004;61:227–237.
  144. Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ, Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy Studies (ARIES) Group. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*. 2008;117:3010–3019.
  145. Chen X, Zhai Z, Huang K, Xie W, Wan J, Wang C. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: A systemic review and meta-analysis. *Clin Respir J*. 2018;12:2065–2074.
  146. Iglarz M, Bossu A, Wanner D, Bortolamiol C, Rey M, Hess P, Clozel M. Comparison of pharmacological activity of macitentan and bosentan in preclinical models of systemic and pulmonary hypertension. *Life Sci*. 2014;118:333–339.
  147. Boss C, Bolli MH, Gatifield J. From bosentan (Tracleer®) to macitentan (Opsumit®): The medicinal chemistry perspective. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26:3381–3394.
  148. Keating GM. Macitentan: A Review in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016;16:453–460.

149. Aypar E, Alehan D, Karagöz T, Aykan HH, Ertugrul İ. Clinical efficacy and safety of switch from bosentan to macitentan in children and young adults with pulmonary arterial hypertension. *Cardiol Young*. 2018;28:542–547.
150. Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galiè N, Ghofrani H-A, Jansa P, Jing Z-C, Le Brun F-O, Mehta S, Mittelholzer CM, Perchenet L, Sastry BKS, Sitbon O, Souza R, Torbicki A, Zeng X, Rubin LJ, Simonneau G, SERAPHIN Investigators. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:809–818.
151. Sitbon O, Simonneau G. Optimal management of severe pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review*. 2011;20:254–261.
152. Ghofrani H-A, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing Z-C, Keogh AM, Langleben D, Kilama MO, Fritsch A, Neuser D, Rubin LJ, PATENT-1 Study Group. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:330–340.
153. Galiè N, Müller K, Scalise A-V, Grünig E. PATENT PLUS: a blinded, randomised and extension study of riociguat plus sildenafil in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2015;45:1314–1322.
154. Clapp LH, Gurung R. The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension: Role of membrane versus nuclear receptors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2015;120:56–71.
155. Zardi EM, Zardi DM, Cacciapaglia F, Dobrina A, Amoroso A, Picardi A, Afeltra A. Endothelial dysfunction and activation as an expression of disease: role of prostacyclin analogs. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:437–459.
156. Wharton J, Davie N, Upton PD, Yacoub MH, Polak JM, Morrell NW. Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;102:3130–3136.
157. Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Pharmacol*. 1995;48:890–896.
158. Hoshikawa Y, Voelkel NF, Gesell TL, Moore MD, Morris KG, Alger LA, Narumiya S, Geraci MW. Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:314–318.
159. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1925–1932.
160. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327:70–75.
161. McLaughlin VV, Oudiz RJ, Frost A, Tapson VF, Murali S, Channick RN, Badesch DB, Barst RJ, Hsu HH, Rubin LJ. Randomized study of adding inhaled iloprost to existing bosentan in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1257–1263.

162. Sitbon O, Channick R, Chin KM, Frey A, Gaine S, Galiè N, Ghofrani H-A, Hoepfer MM, Lang IM, Preiss R, Rubin LJ, Di Scala L, Tapson V, Adzerikho I, Liu J, Moiseeva O, Zeng X, Simonneau G, McLaughlin VV, GRIPHON Investigators. Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2015;373:2522–2533.
163. Galiè N, Palazzini M, Manes A. Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. *Eur Heart J*. 2010;31:2080–2086.
164. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, St Hilaire C, Shanahan C. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*. 2014;35:1515–1525.
165. Leopold JA. Vascular Calcification: Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *Trends Cardiovasc Med*. 2015;25:267–274.
166. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:715–723.
167. Evrard SM, Lecce L, Michelis KC, Nomura-Kitabayashi A, Pandey G, Purushothaman K-R, d'Escamard V, Li JR, Hadri L, Fujitani K, Moreno PR, Benard L, Rimmelé P, Cohain A, Mecham B, Randolph GJ, Nabel EG, Hajjar R, Fuster V, Boehm M, Kovacic JC. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun* [Internet]. 2016 [cited 2019 Nov 5];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4931033/>
168. Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G. Endothelial–mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2018;114:565–577.
169. Chen P-Y, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest*. 2015;125:4514–4528.
170. Burtenshaw D, Kitching M, Redmond EM, Megson IL, Cahill PA. Reactive Oxygen Species (ROS), Intimal Thickening, and Subclinical Atherosclerotic Disease. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 5];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6688526/>
171. Boström KI, Yao J, Guihard PJ, Blazquez-Medela AM, Yao Y. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerotic lesion calcification. *Atherosclerosis*. 2016;253:124–127.
172. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res*. 2018;114:590–600.
173. Shoshani O, Zipori D. Transition of endothelium to cartilage and bone. *Cell Stem Cell*. 2011;8:10–11.
174. Speer MY, Yang H-Y, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin W-L, Frutkin A, Dichek D, Giachelli CM. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res*. 2009;104:733–741.
175. Bobryshev YV. Transdifferentiation of smooth muscle cells into chondrocytes in atherosclerotic arteries in situ: implications for diffuse intimal calcification. *The Journal of Pathology*. 2005;205:641–650.

176. Doehring LC, Heeger C, Aherrahrou Z, Kaczmarek PM, Erdmann J, Schunkert H, Ehlers E-M. Myeloid CD34+CD13+ Precursor Cells Transdifferentiate into Chondrocyte-Like Cells in Atherosclerotic Intimal Calcification. *The American Journal of Pathology*. 2010;177:473–480.
177. Fadini Gian Paolo, Albiero Mattia, Menegazzo Lisa, Boscaro Elisa, Vigili de Kreutzenberg Saula, Agostini Carlo, Cabrelle Anna, Binotto Gianni, Rattazzi Marcello, Bertacco Elisa, Bertorelle Roberta, Biasini Lorena, Mion Monica, Plebani Mario, Ceolotto Giulio, Angelini Annalisa, Castellani Chiara, Menegolo Mirko, Grego Franco, Dimmeler Stefanie, Seeger Florian, Zeiher Andreas, Tiengo Antonio, Avogaro Angelo. Widespread Increase in Myeloid Calcifying Cells Contributes to Ectopic Vascular Calcification in Type 2 Diabetes. *Circulation Research*. 2011;108:1112–1121.
178. Cianciolo G, Capelli I, Cappuccilli M, Schillaci R, Cozzolino M, La Manna G. Calcifying circulating cells: an uncharted area in the setting of vascular calcification in CKD patients. *Clin Kidney J*. 2016;9:280–286.
179. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular Calcification: an Update on Mechanisms and Challenges in Treatment. *Calcif Tissue Int*. 2013;93:365–373.
180. Strauss HW, Nakahara T, Narula N, Narula J. Vascular Calcification: The Evolving Relationship of Vascular Calcification to Major Acute Coronary Events. *J Nucl Med*. 2019;60:1207–1212.
181. O'Rourke C, Shelton G, Hutcheson JD, Burke MF, Martyn T, Thayer TE, Shakartzi HR, Buswell MD, Tainsh RE, Yu B, Bagchi A, Rhee DK, Wu C, Derwall M, Buys ES, Yu PB, Bloch KD, Aikawa E, Bloch DB, Malhotra R. Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells and Imaging of Aortic Calcification and Inflammation. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 [cited 2019 Nov 4]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4927747/>
182. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification – a systematic review. *Med Sci Monit*. 2012;18:RA1–RA11.
183. Nakahara T, Dweck MR, Narula N, Pisapia D, Narula J, Strauss HW. Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2017;10:582–593.
184. Giachelli CM. Vascular Calcification Mechanisms. *JASN*. 2004;15:2959–2964.
185. Shao Jian-Su, Cheng Su-Li, Sadhu Justin, Towler Dwight A. Inflammation and the Osteogenic Regulation of Vascular Calcification. *Hypertension*. 2010;55:579–592.
186. Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72:2475–2489.
187. Lee H-L, Woo KM, Ryoo H-M, Baek J-H. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1087–1092.
188. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res*. 2002;91:9–16.
189. Luo G, Li F, Li X, Wang Z-G, Zhang B. TNF- $\alpha$  and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol Med Rep*. 2018;17:6605–6611.

190. Deuell K, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF- $\alpha$ . *J Vasc Res*. 2012;49:510–521.
191. Hofbauer LC, Schrader J, Niebergall U, Viereck V, Burchert A, Hörsch D, Preissner KT, Schoppet M. Interleukin-4 differentially regulates osteoprotegerin expression and induces calcification in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*. 2006;95:708–714.
192. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79:360–376.
193. Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y. Oxidative Stress Induces Vascular Calcification through Modulation of the Osteogenic Transcription Factor Runx2 by AKT Signaling. *J Biol Chem*. 2008;283:15319–15327.
194. Sutra T, Morena M, Bargnoux A-S, Caporiccio B, Canaud B, Cristol J-P. Superoxide production: A procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radical Research*. 2008;42:789–797.
195. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*. 2015;5:194–222.
196. Lin JH, Walter P, Yen TSB. Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:399–425.
197. Duan X-H, Chang J-R, Zhang J, Zhang B-H, Li Y-L, Teng X, Zhu Y, Du J, Tang C-S, Qi Y-F. Activating transcription factor 4 is involved in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributing to vascular calcification. *Apoptosis*. 2013;18:1132–1144.
198. Liu TM, Lee EH. Transcriptional Regulatory Cascades in Runx2-Dependent Bone Development. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19:254–263.
199. Liberman M, Johnson RC, Handy DE, Loscalzo J, Leopold JA. Bone Morphogenetic Protein-2 Activates NADPH Oxidase to Increase Endoplasmic Reticulum Stress and Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Calcification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413:436–441.
200. Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49:2379–2393.
201. Cunningham KS, Gottlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*. 2005;85:9–23.
202. Nicoll R, Henein M. Arterial calcification: A new perspective? *International Journal of Cardiology*. 2017;228:11–22.
203. Mahmoud MM, Serbanovic-Canic J, Feng S, Souilhol C, Xing R, Hsiao S, Mammoto A, Chen J, Ariaans M, Francis SE, Heiden KV der, Ridger V, Evans PC. Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail. *Sci Rep*. 2017;7:1–12.
204. Lai B, Li Z, He M, Wang Y, Chen L, Zhang J, Yang Y, Shyy JY-J. Atheroprone flow enhances the endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315:H1293–H1303.

205. Tang Y, Weiss SJ. Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation. *Cell Cycle*. 2017;16:399–405.
206. Basalyga Dina M., Simionescu Dan T., Xiong Wanfen, Baxter B. Timothy, Starcher Barry C., Vyavahare Narendra R. Elastin Degradation and Calcification in an Abdominal Aorta Injury Model. *Circulation*. 2004;110:3480–3487.
207. Duca L, Blaise S, Romier B, Laffargue M, Gayral S, El Btaouri H, Kawecki C, Guillot A, Martiny L, Debelle L, Maurice P. Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc Res*. 2016;110:298–308.
208. Demer LL, Tintut Y. Vascular Calcification: Pathobiology of a Multifaceted Disease. *Circulation*. 2008;117:2938–2948.
209. Müller KH, Hayward R, Rajan R, Whitehead M, Cobb AM, Ahmad S, Sun M, Goldberga I, Li R, Bashtanova U, Puzkarska AM, Reid DG, Brooks RA, Skepper JN, Bordoloi J, Chow WY, Oschkinat H, Groombridge A, Scherman OA, Harrison JA, Verhulst A, D'Haese PC, Neven E, Needham L-M, Lee SF, Shanahan CM, Duer MJ. Poly(ADP-Ribose) Links the DNA Damage Response and Biomineralization. *Cell Rep*. 2019;27:3124-3138.e13.
210. Wang C, Xu W, An J, Liang M, Li Y, Zhang F, Tong Q, Huang K. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates vascular calcification by upregulating Runx2. *Nat Commun*. 2019;10:1203.
211. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12:1260–1268.
212. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnchen-Dechent W. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*. 2003;112:357–366.
213. Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386:78–81.
214. Zebboudj AF, Imura M, Boström K. Matrix GLA Protein, a Regulatory Protein for Bone Morphogenetic Protein-2. *J Biol Chem*. 2002;277:4388–4394.
215. Gungor O, Kocyigit I, Yilmaz MI, Sezer S. Role of vascular calcification inhibitors in preventing vascular dysfunction and mortality in hemodialysis patients. *Seminars in Dialysis*. 2018;31:72–81.
216. Blaha MJ, Mortensen MB, Kianoush S, Tota-Maharaj R, Cainzos-Achirica M. Coronary Artery Calcium Scoring: Is It Time for a Change in Methodology? *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2017;10:923–937.
217. Sandfort V, Bluemke DA. CT calcium scoring. History, current status and outlook. *Diagnostic and Interventional Imaging*. 2017;98:3–10.
218. A Rosetta Stone for Coronary Calcium Risk Stratification: Agatston, Volume, and Mass Scores in 11,490 Individuals : American Journal of Roentgenology : Vol. 181, No. 3 (AJR). *American Journal of Roentgenology* [Internet]. [cited 2019 Nov 4]; Available from: <https://www.ajronline.org/acces.bibl.ulaval.ca/doi/full/10.2214/ajr.181.3.1810743>

219. Alluri K, Joshi PH, Henry TS, Blumenthal RS, Nasir K, Blaha MJ. Scoring of coronary artery calcium scans: history, assumptions, current limitations, and future directions. *Atherosclerosis*. 2015;239:109–117.
220. Avolio A. Arterial Stiffness. *Pulse*. 2013;1:14–28.
221. Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, McMurtry MS, Michalak M, Vance JE, Sessa WC, Michelakis ED. The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2011;3:88ra55.
222. Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Sutendra G, Michelakis ED. Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2013;127:115–125.
223. Meloche J, Courchesne A, Barrier M, Carter S, Bissierier M, Paulin R, Lauzon-Joset J-F, Breuils-Bonnet S, Tremblay É, Biardel S, Racine C, Courture C, Bonnet P, Majka SM, Deshaies Y, Picard F, Provencher S, Bonnet S. Critical role for the advanced glycation end-products receptor in pulmonary arterial hypertension etiology. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e005157.
224. Nakamura K, Sakaguchi M, Matsubara H, Akagi S, Sarashina T, Ejiri K, Akazawa K, Kondo M, Nakagawa K, Yoshida M, Miyoshi T, Ogo T, Oto T, Toyooka S, Higashimoto Y, Fukami K, Ito H. Crucial role of RAGE in inappropriate increase of smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE*. 2018;13:e0203046.
225. Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulin A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Couture C, Michelakis ED, Provencher S, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2014;129:786–797.
226. Schäfer M, Kheifets VO, Schroeder JD, Dunning J, Shandas R, Buckner JK, Browning J, Hertzberg J, Hunter KS, Fenster BE. Main pulmonary arterial wall shear stress correlates with invasive hemodynamics and stiffness in pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2016;6:37–45.
227. Smith P, Kay JM, Heath D. Hypertensive pulmonary vascular disease in rats after prolonged feeding with *Crotalaria spectabilis* seeds. *The Journal of Pathology*. 1970;102:97–106.
228. Courboulin A, Paulin R, Giguère NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Côté J, Simard MJ, Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011;208:535–548.
229. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010;28:357–364.
230. Kwon T-G, Zhao X, Yang Q, Li Y, Ge C, Zhao G, Franceschi RT. Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 $\alpha$  induce vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cell Biochem*. 2011;112:3582–3593.
231. Lee S-H, Che X, Jeong J-H, Choi J-Y, Lee Y-J, Lee Y-H, Bae S-C, Lee Y-M. Runx2 Protein Stabilizes Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  through Competition with von Hippel-Lindau Protein (pVHL) and Stimulates Angiogenesis in Growth Plate Hypertrophic Chondrocytes. *J Biol Chem*. 2012;287:14760–14771.
232. Tanguay VF, Babin C, Giardetti G, Sohler-Poirier C, Ménard-Cholette V, Ranchoux B, Ruffenach G, Montani D, Bonnet S, Provencher S. Enhanced Pulmonary Artery Radiodensity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Sign of Early Calcification? *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199:799–802.

233. Mahapatra S, Nishimura RA, Sorajja P, Cha S, McGoon MD. Relationship of pulmonary arterial capacitance and mortality in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:799–803.
234. Blyth KG, Syeed R, Chalmers J, Foster JE, Saba T, Naeije R, Melot C, Peacock AJ. Pulmonary arterial pulse pressure and mortality in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2007;101:2495–2501.
235. Cui R-R, Li S-J, Liu L-J, Yi L, Liang Q-H, Zhu X, Liu G-Y, Liu Y, Wu S-S, Liao X-B, Yuan L-Q, Mao D-A, Liao E-Y. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res*. 2012;96:320–329.
236. Idelevich A, Rais Y, Monsonego-Ornan E. Bone Gla protein increases HIF-1alpha-dependent glucose metabolism and induces cartilage and vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:e55–71.
237. Li G, Lu W, Ai R, Yang J, Chen F, Tang Z. The relationship between serum hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and coronary artery calcification in asymptomatic type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:52.
238. Allison MA, Hsi S, Wassel CL, Morgan C, Ix JH, Wright CM, Criqui MH. Calcified atherosclerosis in different vascular beds and the risk of mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:140–146.
239. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:827–832.
240. Kavousi M, Elias-Smale S, Rutten JHW, Leening MJG, Vliegenthart R, Verwoert GC, Krestin GP, Oudkerk M, de Maat MPM, Leebeek FWG, Mattace-Raso FUS, Lindemans J, Hofman A, Steyerberg EW, van der Lugt A, van den Meiracker AH, Witteman JCM. Evaluation of newer risk markers for coronary heart disease risk classification: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2012;156:438–444.
241. Polonsky TS, McClelland RL, Jorgensen NW, Bild DE, Burke GL, Guerci AD, Greenland P. Coronary artery calcium score and risk classification for coronary heart disease prediction. *JAMA*. 2010;303:1610–1616.
242. Leening MJG, Elias-Smale SE, Kavousi M, Felix JF, Deckers JW, Vliegenthart R, Oudkerk M, Hofman A, Steyerberg EW, Stricker BHC, Witteman JCM. Coronary calcification and the risk of heart failure in the elderly: the Rotterdam Study. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2012;5:874–880.
243. Bos D, Leening MJG, Kavousi M, Hofman A, Franco OH, van der Lugt A, Vernooij MW, Ikram MA. Comparison of Atherosclerotic Calcification in Major Vessel Beds on the Risk of All-Cause and Cause-Specific Mortality: The Rotterdam Study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2015;8.
244. Bos D, Bozorgpourniazi A, Mutlu U, Kavousi M, Vernooij MW, Moelker A, Franco OH, Koudstaal PJ, Ikram MA, van der Lugt A. Aortic Valve Calcification and Risk of Stroke: The Rotterdam Study. *Stroke*. 2016;47:2859–2861.
245. Criqui MH, Denenberg JO, Ix JH, McClelland RL, Wassel CL, Rifkin DE, Carr JJ, Budoff MJ, Allison MA. Calcium density of coronary artery plaque and risk of incident cardiovascular events. *JAMA*. 2014;311:271–278.
246. Blaha MJ, Cainzos-Achirica M, Greenland P, McEvoy JW, Blankstein R, Budoff MJ, Dardari Z, Sibley CT, Burke GL, Kronmal RA, Szklo M, Blumenthal RS, Nasir K. Role of Coronary Artery Calcium Score of

- Zero and Other Negative Risk Markers for Cardiovascular Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*. 2016;133:849–858.
247. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, Greenland P, Lackland DT, Levy D, O'Donnell CJ, Robinson JG, Schwartz JS, Shero ST, Smith SC, Sorlie P, Stone NJ, Wilson PWF, Jordan HS, Nevo L, Wnek J, Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen W-K, Smith SC, Tomaselli GF, American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129:S49-73.
248. Bos D, Leening MJG. Leveraging the coronary calcium scan beyond the coronary calcium score. *Eur Radiol*. 2018;28:3082–3087.
249. Mori H, Torii S, Kutyna M, Sakamoto A, Finn AV, Virmani R. Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean? *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018;11:127–142.
250. Rajaram S, Swift AJ, Condliffe R, Johns C, Elliot CA, Hill C, Davies C, Hurdman J, Sabroe I, Wild JM, Kiely DG. CT features of pulmonary arterial hypertension and its major subtypes: a systematic CT evaluation of 292 patients from the ASPIRE Registry. *Thorax*. 2015;70:382–387.
251. Kristanto W, van Ooijen PMA, Groen JM, Vliegenthart R, Oudkerk M. Small calcified coronary atherosclerotic plaque simulation model: minimal size and attenuation detectable by 64-MDCT and MicroCT. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2012;28:843–853.
252. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:111–117.
253. Chemla D, Hébert JL, Coirault C, Zamani K, Suard I, Colin P, Lecarpentier Y. Total arterial compliance estimated by stroke volume-to-aortic pulse pressure ratio in humans. *Am J Physiol*. 1998;274:H500-505.
254. McLaughlin VV, Badesch DB, Delcroix M, Fleming TR, Gaine SP, Galie N, Gibbs JSR, Kim NH, Oudiz RJ, Peacock A, Provencher S, Sitbon O, Tapson VF, Seeger W. End points and clinical trial design in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S97-107.
255. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev*. 1989;47:23–25.
256. Otsuka F, Finn AV, Virmani R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis*. 2013;229:34–37.
257. Mauriello A, Servadei F, Zoccai GB, Giacobbi E, Anemona L, Bonanno E, Casella S. Coronary calcification identifies the vulnerable patient rather than the vulnerable Plaque. *Atherosclerosis*. 2013;229:124–129.
258. Federici C, Drake KM, Rigelsky CM, McNelly LN, Meade SL, Comhair SAA, Erzurum SC, Aldred MA. Increased Mutagen Sensitivity and DNA Damage in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:219–228.
259. Abdul-Salam VB, Wharton J, Cupitt J, Berryman M, Edwards RJ, Wilkins MR. Proteomic analysis of lung tissues from patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;122:2058–2067.

260. Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JPM, Schurgers LJ, Mutsaers PHA, van der Vusse GJ. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am J Pathol*. 2011;178:2879–2887.
261. Maurovich-Horvat P, Ferencik M, Voros S, Merkely B, Hoffmann U. Comprehensive plaque assessment by coronary CT angiography. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:390–402.
262. Mok MY, Lau CS, Chiu SSH, Tso AWK, Lo Y, Law LSC, Mak KF, Wong WS, Khong PL, Lam KSL. Systemic sclerosis is an independent risk factor for increased coronary artery calcium deposition. *Arthritis Rheum*. 2011;63:1387–1395.
263. Grams AE, Rehwald R, Schmittnägerl C, Schmidt T, Tanislav C, Berghoff M, Krombach GA, Moritz R, Obert M, Gizewski ER, Glodny B. Factors influencing intracranial vessel densities on unenhanced computed tomography: differences between hemispheres. *Clin Imaging*. 2016;40:1081–1085.
264. Black DF, Rad AE, Gray LA, Campeau NG, Kallmes DF. Cerebral venous sinus density on noncontrast CT correlates with hematocrit. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32:1354–1357.
265. Lamprea-Montealegre JA, McClelland RL, Astor BC, Matsushita K, Shlipak M, de Boer IH, Szklo M. Chronic kidney disease, plasma lipoproteins, and coronary artery calcium incidence: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:652–658.
266. Meloche J, Lampron M-C, Nadeau V, Maltais M, Potus F, Lambert C, Tremblay E, Vitry G, Breuils-Bonnet S, Boucherat O, Charbonneau E, Provencher S, Paulin R, Bonnet S. Implication of Inflammation and Epigenetic Readers in Coronary Artery Remodeling in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1513–1523.
267. Shimony A, Eisenberg MJ, Rudski LG, Schlesinger R, Afilalo J, Joyal D, Dragatakis L, Hirsch A, Boutet K, Fox BD, Langleben D. Prevalence and impact of coronary artery disease in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*. 2011;108:460–464.
268. Montani D, Lau EM, Dorfmueller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
269. Fayyaz AU, Edwards WD, Maleszewski JJ, Konik EA, DuBrock HM, Borlaug BA, Frantz RP, Jenkins SM, Redfield MM. Global Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure and Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Circulation*. 2018;137:1796–1810.
270. Saouti N, Westerhof N, Helderma F, Marcus JT, Boonstra A, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. Right ventricular oscillatory power is a constant fraction of total power irrespective of pulmonary artery pressure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:1315–1320.

## **Annexe A**

### **Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension.**

**Am J Respir Crit Care Med. 2016 Nov 15;194(10):1273-1285.**

Ruffenach G<sup>1</sup>, Chabot S<sup>1</sup>, Tanguay VF<sup>1</sup>, Courboulin A<sup>2</sup>, Boucherat O<sup>1</sup>, Potus F<sup>1</sup>, Meloche J<sup>1</sup>, Pflieger A<sup>1</sup>, Breuils-Bonnet S<sup>1</sup>, Nadeau V<sup>1</sup>, Paradis R<sup>1</sup>, Tremblay E<sup>1</sup>, Girerd B<sup>2</sup>, Hautefort A<sup>2</sup>, Montani D<sup>2</sup>, Fadel E<sup>2</sup>, Dorfmueller P<sup>2</sup>, Humbert M<sup>2</sup>, Perros F<sup>1,2</sup>, Paulin R<sup>1</sup>, Provencher S<sup>1</sup>, Bonnet S<sup>1</sup>.

1. Pulmonary Hypertension Research Group, Quebec Heart and Lung Institute Research Center, Department of Medicine, Laval University, Quebec, Canada
2. UMR-S 999, INSERM and University Paris-Sud, Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France.

## **Annexe B**

# **Enhanced Pulmonary Artery Radiodensity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Sign of Early Calcification?**

**Am J Respir Crit Care Med. 2019 Mar 15;199(6):799-802.**

Tanguay VF<sup>1,2</sup>, Babin C<sup>1,2</sup>, Giardetti G<sup>1,2</sup>, Sohier-Poirier C<sup>1,2</sup>, Ménard-Cholette V<sup>1,2</sup>, Ranchoux B<sup>1,2</sup>, Ruffenach G<sup>1,2</sup>, Montani D<sup>3</sup>, Bonnet S<sup>1,2</sup>, Provencher S<sup>1,2</sup>.

1. Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec, Québec, Canada
2. Université Laval, Québec, Québec, Canada
3. Université Paris-Sud, Le Kremlin Bicêtre, France.