



# Mécanismes cellulaires et moléculaires dans la dysfonction endothéliale dans l'hypertension pulmonaire post-embolique

Jennifer Arthur Ataam

► **To cite this version:**

Jennifer Arthur Ataam. Mécanismes cellulaires et moléculaires dans la dysfonction endothéliale dans l'hypertension pulmonaire post-embolique. Pneumologie et système respiratoire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. <NNT : 2016SACLS246>. <tel-01391616>

**HAL Id: tel-01391616**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01391616>**

Submitted on 3 Nov 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**NNT : 2016SACLS246**

**Thèse de doctorat  
de  
L'Université Paris-Saclay  
préparée à  
"Unité Recherche et Innovation-INSERM U999"**

**ECOLE DOCTORALE N° 569  
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué**

**Spécialité de doctorat : Physiologie, Physiopathologie**

Par

**Mme ARTHUR ATAAM Jennifer**

**Mécanismes cellulaires et moléculaires dans la dysfonction  
endothéliale dans l'Hypertension Pulmonaire Post-Embolique**

**Thèse présentée et soutenue à l'Hôpital Marie Lannelongue, le 20 septembre 2016**

**Composition du Jury :**

|                               |                          |                       |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Mr le Pr Olaf MERCIER         | PU-PH, INSERM, Paris-Sud | Président du jury     |
| Mr le Pr Olivier SANCHEZ      | PU-PH, INSERM,           | Rapporteur            |
| Mr le Pr Jean Pierre SAVINEAU | PR, INSERM, Bordeaux     | Rapporteur            |
| Mr le Pr Olaf MERCIER         | PU-PH, INSERM, Paris-Sud | Examineur             |
| Mr le Pr Marc HUMBERT         | PU-PH, INSERM, Paris-Sud | Examineur             |
| Mr le Pr Elie FADEL           | PU-PH, INSERM, Paris-Sud | Directeur de thèse    |
| Mme le Dr Saadia EDDAHIBI     | DR2, INSERM, Montpellier | Co-directeur de thèse |

**A mes sœurs et mes parents,**

# Remerciements

---

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse Mr Elie FADEL, Professeur des Universités, Directeur du pôle de chirurgie vasculaire et thoracique et Directeur de la Recherche et de l'Innovation à l'Hôpital Marie Lannelongue pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

J'adresse de chaleureux remerciements à ma co-directrice de thèse, Mme Saadia EDDAHIBI, Directrice de Recherche à l'Unité Inserm U1046 à Montpellier, pour son attention de tout instant sur mes travaux, pour ses conseils avisés et son écoute durant toute ma thèse. Son énergie et sa confiance ont été des éléments moteurs pour moi. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.

J'adresse de sincères remerciements à Mr Olaf MERCIER, Professeur des Universités et Directeur de l'Unité de Recherche et d'Innovation, pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse, pour ses nombreux conseils, son écoute et son énergie. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec toi.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse Mr Olivier SANCHEZ, Professeur des Universités et Mr Jean-Pierre SAVINEAU, Directeur de Recherche de l'Unité INSERM U1045 de Bordeaux pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'associe à ces remerciements Mr Marc Humbert, Professeur des Universités et Directeur de l'Unité INSERM U999 et Mr Olaf MERCIER, Professeur des Universités, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je sais que ces quelques lignes ne suffiront pas pour vous témoigner tous mes remerciements mais je vais quand même essayer. Je souhaite remercier tout particulièrement Lilia et Flo (mon flocon) pour votre soutien, votre patience, votre bonne humeur et surtout votre amitié inconditionnelle tout au long de ma thèse. Sans vous, je n'y serais pas arrivé.

Je désire grandement remercier Benoit pour m'avoir accueilli chaleureusement, pour sa gentillesse et également pour son amitié et surtout d'avoir pris le temps de m'écouter à chaque fois ....

Je tiens à remercier Aurélie (mon double et mon ptit poulet à la fois). Je suis heureuse de te compter parmi mes amies. Tu es une de mes plus belles rencontres au sein de ce labo.

Je tiens à remercier Fabrice (le chef), Mélanie (ma faiseuse de cookies), Véro (un repère), Yann (un grand cœur), Philippe (Mr Cellules souches), Sana (mon chouchou) et Pierre pour leur bonne humeur et leurs précieux conseils. Nous avons partagé de bons moments.

Je tiens à remercier tous les membres de l'Unité de Recherche et d'Innovation, ceux de l'Unité INSERM U999 ainsi que l'Unité INSERM U1046.

***Mes plus grands remerciements et un respect infini s'adressent à mes parents et mes sœurs Joanna et Stephanie qui sont ma plus grande force et mon unique motivation dans la vie.***

# Table des matières

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Table des matières</b> .....   | 4  |
| <b>Liste des travaux</b> .....  | 7  |
| <b>Listes des figures</b> .....   | 9  |
| <b>Liste des tableaux</b> .....   | 10 |
| <b>Liste des abréviations</b> .....                                       | 11 |
| <b>Avant-Propos</b> .....   | 12 |
| <b>Introduction</b> .....   | 14 |
| Chapitre 1 : Généralités .....  | 14 |
| I.    La circulation pulmonaire.....                                      | 14 |
| II.   Présentation clinique de l'hypertension pulmonaire (HTP).....       | 15 |
| III.  Les classifications de l'HTP.....                                   | 17 |
| Chapitre 2 : L'hypertension pulmonaire post-embolique .....               | 21 |
| I.    Définition et épidémiologie de l'HPPE.....                          | 21 |
| II.   Signes cliniques, diagnostic et suivi de l'HPPE .....               | 22 |
| 1.  Signes cliniques.....   | 22 |
| 2.  Diagnostic.....   | 23 |
| 3.  Suivi de l'HPPE.....  | 26 |
| 4.  Formes cliniques particulières.....                                   | 26 |
| 4.1  Hypertension pulmonaire d'effort .....                               | 26 |
| 4.2  Hypertension pulmonaire aiguë sur HPPE.....                          | 26 |
| III.  Classification clinique de l'HPPE.....                              | 27 |
| Chapitre 3 : Aspects physiopathologiques caractéristiques de l'HPPE ..... | 28 |
| I.    Anomalies morphologiques .....                                      | 29 |
| II.   Mécanismes cellulaires .....  | 33 |
| 1.  L'endothélium du poumon normal .....                                  | 33 |
| 2.  L'endothélium dans l'HPPE.....  | 33 |
| 2.1  Phénotype.....   | 33 |
| 2.2  Les cellules endothéliales circulantes .....                         | 34 |
| 3.  Cellules musculaires lisses, fibroblastes et myofibroblastes .....    | 35 |
| 4.  Le stimulus initial .....   | 36 |
| III.  Mécanismes moléculaires .....                                       | 37 |
| 1.  Les médiateurs vasoactifs.....  | 37 |
| 1.1  Oxyde Nitrique.....  | 37 |
| 1.2  Prostacycline .....  | 38 |
| 1.3  L'endothéline-1 = ET-1 .....   | 39 |
| 2.  Les médiateurs de l'inflammation.....                                 | 41 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 2.1   | Les interleukines : IL-1 $\beta$ et IL-6.....                           | 42 |
| 2.2   | Les chimiokines .....   | 43 |
| 3.  | Les médiateurs du remodelage vasculaire : angiogénèse et apoptose ..... | 45 |
| 1.  | Le VEGF.....  | 46 |
| 2.  | FGF : Fibroblast growth factor.....                                     | 47 |
| 3.  | PDGF :Platelet-derived growth factor.....                               | 49 |
| 4.  | EGF : Epidermal growth factor .....                                     | 50 |
| 5.  | S100A4/Mts1 (S100 calcium binding protein A4) .....                     | 52 |
| 6.  | L'Angiopoiétine .....   | 52 |
| 4.  | Les médiateurs du processus d'adhésion cellulaire .....                 | 54 |
| 1.  | Les intégrines .....  | 55 |
| 2.  | Les cadhérines .....  | 56 |
| 3.  | Les sélectines .....  | 57 |
| 4.  | Les immunoglobulines.....   | 58 |
| 4.1   | ICAM.....   | 58 |
| 4.2   | VCAM .....  | 65 |
| 5.  | Les médiateurs de la coagulation.....                                   | 66 |
| 5.1   | Le système plasmine-plasminogène.....                                   | 67 |
| 5.2   | Anomalie de coagulation dans l'HPPE .....                               | 68 |
| 5.3   | Fibrinogène et HPPE.....  | 68 |
| 5.4   | La Thrombomoduline .....  | 69 |
| 5.5   | Le facteur von Willebrand (vWF) .....                                   | 69 |
| 5.6   | La perte de la fonction de barrière endothéliale .....                  | 70 |
| Chapitre 4 : Traitement dans l'HPPE .....           |   | 72 |
| I.  | Traitements médicaux .....  | 72 |
| 1.  | Les antagonistes des récepteurs de l'ET : le Bosentan.....              | 72 |
| 2.  | Le Riociguat.....   | 73 |
| 3.  | Les inhibiteurs de phosphodiésterases : le Sildénafil .....             | 74 |
| 4.  | Prostaglandines prostanoides (époprosténol-tréprostinil-iloprost) ..... | 75 |
| 4.1   | Epoprosténol .....  | 75 |
| 4.2   | Tréprostinil ou UT-15 .....   | 76 |
| 4.3   | Iloprost.....   | 76 |
| II.   | Traitements chirurgicaux .....  | 77 |
| 1.  | Thrombo-endartériectomie ou endartériectomie pulmonaire.....            | 77 |
| 2.  | Angioplastie pulmonaire .....   | 79 |
| 3.  | Transplantation pulmonaire .....  | 81 |
| Chapitre 5 : Modèles expérimentaux dans l'HPPE..... |   | 82 |
| I.  | Modèles animaux de thrombose intravasculaire persistante.....           | 82 |
| II.   | Modèles reproduisant l'obstruction de l'artère pulmonaire .....         | 84 |
| III.  | Modèle reproduisant les lésions non obstruées dans l'HPPE .....         | 85 |

|   |   |     |
|---|---|-----|
| IV.   | Modèle animal reproduisant les caractéristiques de l'HPPE .....   | 86  |
| <b>Hypothèses et Objectifs de thèse</b> ..... |   | 93  |
| <b>Matériel et méthodes</b> .....             |   | 96  |
| I.  | Données cliniques des patients et prélèvements réalisés .....     | 96  |
|   | 1. Patients .....   | 96  |
|   | 2. Prélèvements .....   | 97  |
| II.   | Colorations.....  | 97  |
| III.  | Culture cellulaire .....  | 98  |
|   | 1. Isolement des cellules endothéliales.....                      | 98  |
|   | 2. Isolement des cellules musculaires lisses.....                 | 99  |
|   | 3. Isolement de monocytes.....                                    | 100 |
| IV.   | Etude de l'expression génique .....                               | 100 |
|   | 1. Extraction des ARN et Reverse Transcription.....               | 101 |
|   | 2. PCR et quantification.....                                     | 102 |
| V.  | Localisation et quantification protéique .....                    | 102 |
|   | 1. Marquages immunohistochimiques (IHC) sur séquestres d'AP ..... | 102 |
|   | 2. Marquages immunofluorescents sur cellules endothéliales .....  | 103 |
|   | 3. ELISA.....   | 103 |
|   | 4. Western blots.....   | 104 |
| VI.   | Etude des fonctions cellulaires.....                              | 105 |
|   | 1. Evaluation de la Prolifération cellulaire .....                | 105 |
|   | 1.1 Par incorporation de BrdU.....                                | 105 |
|   | 1.2 Par Comptage Cellulaire .....                                 | 105 |
|   | 2. Apoptose.....  | 105 |
|   | 3. Migration cellulaire.....                                      | 106 |
|   | 4. Angiogenèse.....   | 106 |
| VII.  | Etude du polymorphisme du gène ICAM-1 .....                       | 106 |
| VIII.   | Analyses statistiques .....                                       | 107 |
| <b>Résultats</b> .....                        |   | 109 |
| <b>Discussion</b> .....                       |   | 208 |
| <b>Conclusion et perspectives</b> .....       |   | 221 |
| <b>Travaux annexes</b> .....                  |   | 222 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....      |   | 234 |

# Liste des travaux

---

## - Travaux de thèse

### Travail 1 :

**Titre : Abnormal Pulmonary Endothelial Cells May Underlie The Enigmatic Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension**

**Auteurs:** \*Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, \***Jennifer Arthur Ataam**, MSc<sup>1</sup>, Nathaniel B. Langer, MD<sup>1,2</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>

**Etat :** Accepté à JHLT

---

### Travail 2 :

**Titre : A New Facet of Endothelial Intercellular Cell Adhesion Molecules In The Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension**

**Auteurs:** **Jennifer Arthur Ataam**, MSc<sup>1</sup>, Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Joanna Arthur Ataam, MSc<sup>4</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Stephanie Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>

**Etat :** Soumis au AJRCCM

---

### Travail 3 :

**Titre : Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension : Role of Endothelial Fibroblast Growth Factor-2 In The Unresolved fibrotic Thrombus vascularization**

**Auteurs:** **Jennifer Arthur Ataam**, MSc<sup>1</sup>, Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Stephanie Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Joanna Arthur Ataam, MSc<sup>4</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>

**Etat :** En préparation

---



## - Travaux hors thèse

### Travail 1 :

**Titre : The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload**

**Auteurs:** \*Pierre-Emmanuel Noly MD MSc, \*François Haddad MD, **Jennifer Arthur Ataam** MSc, Nathaniel Langer MD, Peter Dorfmuller MD PhD, Matthieu Glorion MD MSc, Julien Guihaire MD MSc, Benoit Decante MSc, Lilia Lamrani MSc, Florence Lecerf BSc, Bruno Baudet BSc, Frederic Secatore BSc, Philippe Dartevelle MD, Elie Fadel MD PhD and Olaf Mercier MD PhD

**Etat :** Soumis à Cardiovascular research

---

### Travail 2 :

**Titre : Right Ventricular Lesions and Biomarkers in Acute on Chronic Pulmonary Hypertension**

**Auteurs:** David Boulate MD, MSc, **Jennifer Arthur Ataam**, MSc, Andrew Conolly, MD, Peter Dorfmuller, MD, PhD, Genevieve Giraldeau, MD, Marc Humbert, MD, PhD, Frederic Perros, PhD, Elie Fadel, MD, PhD, Francois Haddad, MD, and Olaf Mercier, MD, PhD

**Etat :** En preparation

---

### Travail 3 :

**Titre : The pivotal role of Src in human and experimental pulmonary arterial hypertension**

**Auteurs:** Sana Bentebbal, PhD **Jennifer Arthur Ataam**, PhD Olaf Mercier, PhD, MD1, Younss Ait Mou, PhD Florence Lecerf, MS Peter Dorfmuller, PhD, MD, Elie Fadel, PhD, MD, Marc Humbert, PhD, MD, Saadia Eddahibi, PhD

**Etat :** Soumis à ATVB

---

### Travail 4 :

**Titre : Pulmonary microvascular lesions regress in reperfused chronic thromboembolic pulmonary hypertension.**

**Auteurs:** Boulate D, Perros F, Dorfmuller P, Arthur-Ataam J, Guihaire J, Lamrani L, Decante B, Humbert M, Eddahibi S, Dartevelle P, Fadel E, Mercier O.

**Etat :** Paru dans J Heart Lung Transplant. 2015 Mar;34(3):457-67.

---

# Listes des figures

---

Figure 1 : La circulation sanguine

Figure 2 : Classification des Hypertensions Pulmonaires

Figure 3 : Algorithme diagnostique devant une suspicion d'HTAP

Figure 4 : Histologie de poumons de patients atteints d'HPPE : obstruction vasculaire pulmonaire

Figure 5 : Histologie de poumons de patients atteints d'HPPE : microvasculopathie

Figure 6 : Voies des différents médiateurs vasoactifs dans la cellule endothéliale

Figure 7 : Infiltrats inflammatoires dans le séquestre de patients ayant une HPPE

Figure 8 : La famille des VEGF, les récepteurs membranaires (VEGFR) et les corécepteurs (NP1, NP2)

Figure 9 : La voie de signalisation des FGF/FGFR

Figure 10: Les facteurs de croissance PDGF et leurs récepteurs

Figure 11 : Voies d'activation de l'EGFR et niveaux d'action possibles

Figure 12 : Les molécules d'adhésions réparties en 4 familles : les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les immunoglobulines

Figure 13 : Structure d'ICAM et les sites de liaison de l'intégrine de liaison

Figure 14 : Structure du gène ICAM-1

Figure 15 : Les voies de signalisation activées par ICAM-1

Figure 16 : Le système d'activation du plasminogène

Figure 17 : Formes clinico-chirurgicales d'HPPE

Figure 18 : Principe de l'angioplastie pulmonaire

Figure 19 : Angiographie pulmonaire montrant la procédure d'angioplastie pulmonaire.

Figure 20 : Modèle de ligature de la veine cave inférieure

Figure 21 : Modèle porcin d'HPPE montrant l'obstruction de l'artère pulmonaire consistant en la ligature de l'artère pulmonaire gauche suivi de processus d'embolisations répétées dans le lobe inférieur droit.

Figure 22 : Images de cellules endothéliales HPPE en culture.

Figure 23 : Images de cellules musculaires lisses HPPE en culture

Figure 24 : Rôle de la cellule endothéliale dans le maintien du séquestre dans l'HPPE

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Récapitulatif des différents modèles animaux dans la résolution et l'organisation du séquestre

Tableau 2 : Modèles animaux actuels utilisés pour étudier la pathogenèse et la pathobiologie de l'HPPE

# Liste des abréviations

---

- HTP: HyperTension Pulmonaire
- HTAP: HyperTension Artérielle Pulmonaire
- HPPE : Hypertension Pulmonaire Post-Embolique
- HTAPi: HyperTension Artérielle Pulmonaire Idiopathique
- HTAPh: hypertension artérielle pulmonaire héritable
- PAPm: pression artérielle pulmonaire moyenne
- AP: artère pulmonaire
- CML (-AP): cellules musculaires lisses (des artères pulmonaires)
- CE (-AP): cellules endothéliales (des artères pulmonaires)
- NYHA: *New York Heart Association*
- BMPR2: *bone morphogenic protein receptor 2*
- ET-1: endothéline 1
- NO: monoxyde d'azote
- eNOS: synthétase endothéliale de monoxyde d'azote
- 5-HT: sérotonine
- VEGF: *vascular endothelial growth factor*
- PDGF: *platelet-derived growth factor*
- EGF: *epidermal growth factor*
- FGF: *fibroblast growth factor*
- TGF- $\beta$ : *transforming growth factor-beta*
- AMPc: adénosine monophosphate cyclique
- GMPc: guanosine monophosphate cyclique
- PDE: phosphodiéstérases
- Kv: canaux potassiques voltage dépendants
- MAPK: *mitogen-activated protein kinases*
- Ca<sup>++</sup>: ion calcique
- IL: interleukine
- ROS: *reactive oxygen species*
- HIF: *hypoxia inducible factor*
- SNP: *single nucleotide polymorphism*

# Avant-Propos

---

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE) est une conséquence de l'embolie pulmonaire aiguë. L'HPPE est une maladie vasculaire pulmonaire rare, grave pouvant entraîner la mort si elle n'est pas traitée. Elle est définie par une augmentation chronique de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm)  $\geq 25$  mmHg au repos et avec une pression capillaire  $<15$  mmHg et des défauts dans le lit artériel pulmonaire après un traitement anticoagulant de 3 mois.

Elle se développe suite à l'organisation et la persistance de caillots fibreux au sein des artères pulmonaires. Il en résulte une élévation progressive des résistances vasculaires pulmonaires conduisant à une défaillance cardiaque droite.

Cette augmentation anormale est la conséquence de plusieurs facteurs clés dans la pathogénèse de l'HPPE : une obstruction thrombotique de la lumière artérielle et un remodelage microvasculaire. Aux dernières avancées, ce remodelage microvasculaire semble impliquer une dysfonction endothéliale, une prolifération anormale des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, ainsi qu'une agrégation des plaquettes s'associant pour former un séquestre. Cependant, les mécanismes d'initiation de la maladie et sa progression restent à ce jour mal élucidés.

L'objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre la physiopathologie de l'HPPE en s'intéressant à la cellule endothéliale et à l'altération de ses fonctions. L'endothélium pulmonaire est le seul rempart entre la circulation sanguine et le reste de la paroi vasculaire. Il paraît être essentiel dans la compréhension de la physiopathologie de l'HPPE puisqu'il est à la fois au contact avec la lumière vasculaire (siège d'une thrombose ou d'un hyperdébit dans les zones non obstruées et de la cellule musculaire lisse (CML)).

Les CE et CML pulmonaires sont au centre de la physiopathologie de l'HPPE puisque c'est au contact de l'endothélium pulmonaire que le séquestre ne se lyse pas et s'organise.

Afin de bien comprendre le rationnel de ce travail, la première partie de ce manuscrit est constituée d'une introduction décrivant l'HPPE, les mécanismes cellulaires et les mécanismes moléculaires qui peuvent être impliqués dans la physiopathologie de l'HPPE.

# INTRODUCTION

# Introduction

---

## Chapitre 1 : Généralités

### I. La circulation pulmonaire

La vascularisation pulmonaire s'effectue grâce à deux systèmes : la circulation pulmonaire et la circulation systémique (bronchique) (Figure 1).

A chaque battement, le cœur pompe le sang vers deux circuits fermés : la circulation systémique appelée aussi circulation bronchique et la circulation pulmonaire. La circulation pulmonaire, issue du cœur assure les échanges gazeux entre les alvéoles pulmonaires et les capillaires. Ces deux circuits sont distincts mais complémentaires.

Dans la circulation pulmonaire, l'oreillette droite reçoit le sang désoxygéné et chargé en CO<sub>2</sub> de la circulation systémique. En sortant du ventricule droit, le sang passe dans le tronc artériel pulmonaire : Il émerge du ventricule droit et remonte vers l'arrière où il est divisé en deux artères : l'artère pulmonaire (AP) droite et gauche. Ces artères permettent le transport du sang désoxygéné. Dans les poumons, elles se divisent pour former des capillaires autour des alvéoles pulmonaires dans lesquels l'échange CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> se réalise. Le sang oxygéné va ensuite passer par les veines pulmonaires et être acheminé jusqu'à l'oreillette gauche (Guénard, 2001).

La circulation pulmonaire est un système à faible pression ( $\leq 15$  mmHg dans l'artère pulmonaire), de faible résistance, de haute densité et à haut débit qui s'explique par deux critères (Coppock et al., 2001) (Coppock et Tamkun, 2001) (Martens et al., 2001) :

- Une haute compliance des artérioles pré-capillaires due à une paroi fine constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) recouvrant une couche mince de cellules musculaires lisses (CML), en comparaison avec la paroi des vaisseaux de la circulation bronchique qui est bien plus épaisse et remodelée (Coppock et Tamkun, 2001).
- Une grande capacité de recrutement des vaisseaux lors d'une augmentation de flux sanguin

En l'absence d'anomalie, la pression moyenne dans l'AP est de l'ordre de 15 mmHg (Archer et al., 1996).

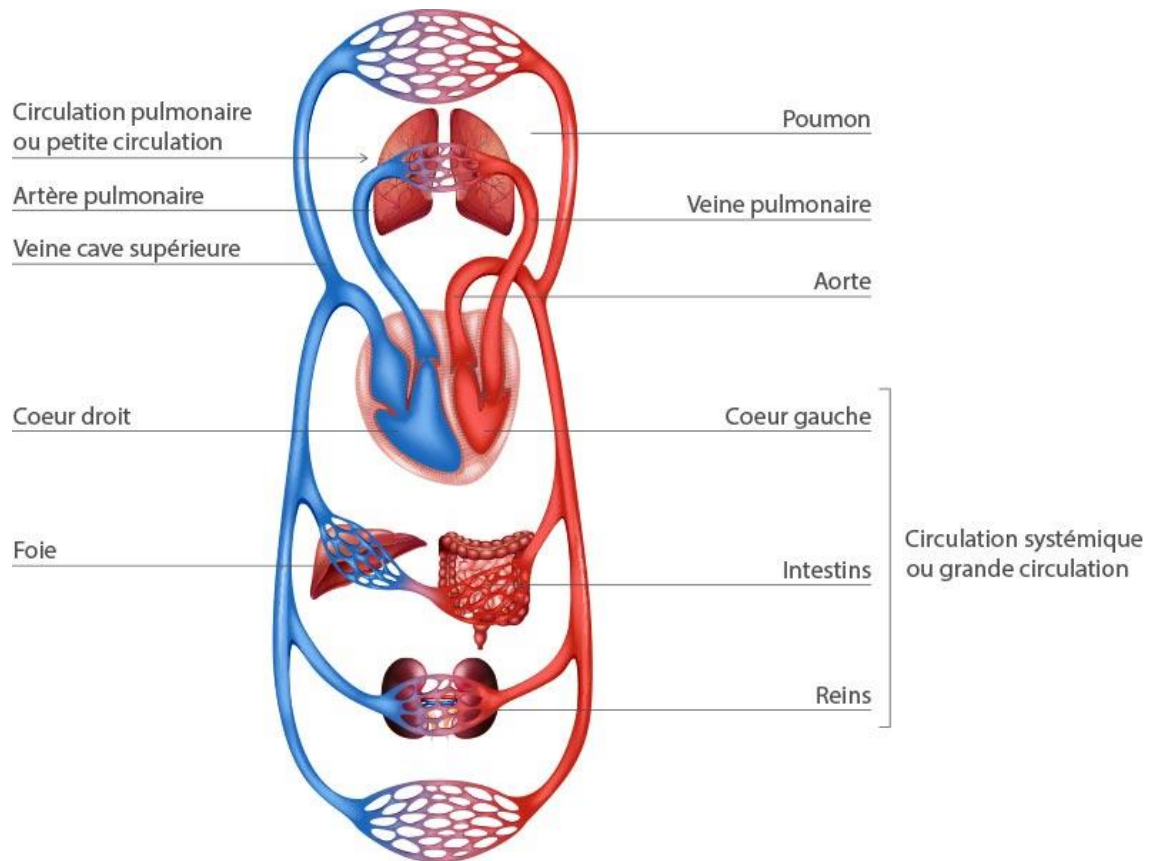


Figure 1 : La circulation sanguine

## II. Présentation clinique de l'hypertension pulmonaire (HTP)

L'hypertension pulmonaire (HTP) est caractérisée par l'augmentation progressive de la pression artérielle pulmonaire et des résistances vasculaires pulmonaires aboutissant à une insuffisance cardiaque droite et au décès. Au cours des dix dernières années, les progrès réalisés dans l'épidémiologie et la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'HTP ont permis une classification clinique plus précise. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une forme particulière d'HTP caractérisée par la prolifération intense de la paroi des petites artères pulmonaires (Simonneau et al., 2009)(Hoeper et al., 2013). On distingue deux types d'HTP : l'HTP pré-capillaire, pour laquelle l'élévation de la PAP est liée à un obstacle en amont des capillaires pulmonaires et l'HTP post-capillaire, pour laquelle l'élévation de la PAP est secondaire à la transmission passive d'une élévation de pression en aval des capillaires pulmonaires (dûe en



général à une insuffisance cardiaque). La distinction entre HTP pré- ou post-capillaire se fait par la mesure de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) lors du cathétérisme cardiaque droit : l'HTP est post-capillaire lorsque la PAPO est élevée (> 15 mmHg). La distinction entre HTP post-capillaire isolée et HTP post- et pré-capillaire associées ne s'établit plus en fonction du gradient transpulmonaire ( $GTP = PAPm - PAPO$ ), trop dépendant des conditions de charge (volémie) et du débit cardiaque. Elle est envisagée dorénavant en fonction du gradient de pression diastolique (GPD) qui est la différence entre la PAP diastolique (PAPd) et la PAPO ( $GDP = PAPd - PAPO$ ). L'HTAP définit un sous-groupe d'HTP de causes diverses mais caractérisées par une physiopathologie proche, et notamment un remodelage intense des artères pulmonaires de petits calibres (diamètre < 500  $\mu m$ ).

L'HTP est une altération rare du système cardio-pulmonaire qui se caractérise par une pression sanguine élevée au niveau des artéioles pulmonaires. Cette pathologie induit une artériopathie pulmonaire, une distension et une dysfonction du ventricule droit. En effet, la circulation au niveau des poumons est ralentie voire freinée ce qui provoque une augmentation de la pression sanguine dans l'artère pulmonaire.

Le diagnostic de cette maladie se fait très souvent à un stade avancé car les symptômes des patients sont peu spécifiques. Les signes fonctionnels fréquemment observés ne permettent pas d'orienter les médecins vers le diagnostic d'HTP comme la fatigue, l'essoufflement ou les douleurs thoraciques. Les principaux symptômes de l'HTP sont une présence d'asthénie et une dyspnée d'effort de plus en plus invalidante jusqu'à devenir permanente. Ces symptômes peuvent être accompagnés d'épisodes de syncopes, de crises d'angor d'effort, d'œdèmes ou d'épisodes d'hémoptysies.

La définition clinique de l'HTAP est une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos (la normale est à 15 mmHg) ou supérieure à 30 mmHg pendant l'exercice. Elle se caractérise également par une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 12 mmHg (hypertension "artériolaire" pulmonaire). Cette valeur permet de la distinguer de l'hypertension artérielle veino-capillaire.

La pression artérielle pulmonaire (PAP) représente la somme de la pression motrice à travers la circulation pulmonaire et de la pression de « sortie » du système qui est la pression capillaire

(PCP). La pression motrice, qui représente la différence PAP-PCP est égale, par définition, au produit du débit sanguin pulmonaire (Q) et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP), d'où la PAP = PCP+ Q x RVP.

Cette équation laisse suggérer que l'HTP peut résulter (1) d'une élévation de la pression capillaire pulmonaire, elle-même consécutive à une élévation de la pression veineuse pulmonaire secondaire à une insuffisance cardiaque gauche (ischémique), ou à un rétrécissement mitral, (2) d'une élévation du débit sanguin pulmonaire comme dans certaines cardiopathies congénitales avec shunt gauche-droit. Dans ces cas-là, il s'agit là de communications interauriculaires et/ou ventriculaires, canal artériel, canal atrio-ventriculaire complet. L'élévation du débit sanguin pulmonaire peut être considérable, allant jusqu'à 200-300%. Au cours de l'évolution, les résistances vasculaires pulmonaires vont s'élever du fait de modifications structurelles secondaires des artères pulmonaires comme l'épaississement de la media et la fibrose de l'intima, (3) d'une élévation des résistances vasculaires pulmonaires. Elle touche principalement les affections respiratoires chroniques. Les résistances à l'écoulement sanguin se localisent au niveau des artères pré-capillaires.

### III. Les classifications de l'HTP

La première classification clinique de l'HTP a été établie en 1973. Cette classification a permis d'individualiser différentes catégories ayant des similitudes dans les mécanismes physiopathologiques, la présentation clinique et les thérapies envisagées. Elle a permis la standardisation du diagnostic, du traitement mais également de regrouper des patients homogènes au sein d'études cliniques.

Dans cette classification, l'HTP se divisait en deux groupes : l'hypertension pulmonaire primitive (HPP) et l'HTP secondaire. Ces deux groupes se définissent en fonction de la présence ou l'absence de causes identifiées ou de facteurs de risques.

Le diagnostic d'HPP était un diagnostic d'exclusion retenu après avoir écarté toutes les causes d'hypertension pulmonaire. Malheureusement, cette classification s'est révélée confuse et arbitraire. En effet, les mécanismes de certaines HTP secondaires sont souvent flous et ceci

malgré l'identification d'une cause comme l'infection au VIH ou l'hypertension portale ou la présence d'une communication inter-auriculaire de petite taille.

Par contre, dans certaines situations cliniques, la cause est plus évidente comme dans l'HTAP obstructive des maladies thrombo-emboliques chroniques ou les HTAP hypoxiques des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO). Suite à toutes ces constatations, une nouvelle classification clinique des HTAP a été établie en 1998 et validée par l'OMS. La classification est basée sur la similitude des lésions histologiques, leurs physiopathologies et des thérapies, ainsi on retrouve dans la même classe les HTAP primitives ainsi que certaines HTAP associées à d'autres pathologies.

Les autres HTAP ont été regroupées dans un groupe qui leur est propre suivant leurs mécanismes physiopathologiques comme l'élévation de la pression veineuse pulmonaire (hypertension veineuse pulmonaire), la vasoconstriction pulmonaire hypoxique (maladies pulmonaires hypoxiques chroniques et hypoxie atmosphérique), l'obstruction mécanique (HPPE). Depuis, cette classification a été revue et corrigée en 1998, 2003 et 2008 pour être une nouvelle fois affinée lors du cinquième symposium sur l'HTP à Nice (Figure 2) (Simonneau et al., 2013).

Cinq groupes de causes à l'origine de l'HTP ont été identifiés :

**Le premier groupe** d'HTAP dit sans cause identifiable regroupe essentiellement les formes sporadiques, familiales ainsi que les maladies veino-occlusives. Ces différents sous-groupes présentent des similitudes au niveau du type des lésions et de leur localisation au niveau distal bien que les mécanismes responsables du remodelage des artérioles pulmonaires dans ces différentes situations soient encore mal connus (caractéristiques anatomopathologiques et cliniques).

**Le deuxième groupe** est la catégorie « hypertension veineuse pulmonaire ». Elle est souvent la conséquence de cardiopathies et de valvulopathies gauches. C'est pourquoi dans le traitement de cette forme d'HTAP, on utilisera des thérapies améliorant directement les performances du myocarde ou soulageant les anomalies mécaniques des valves.

**Le troisième groupe** représente des désordres du système respiratoire ou liés à l'hypoxémie. La cause principale est la mauvaise oxygénation du sang artériel qui résulte soit d'un mauvais échange gazeux suite à une atteinte pulmonaire soit à une exposition à un environnement

hypoxique (séjour en haute altitude). Dans ce groupe, l'élévation de la PAPm est habituellement modeste (< 35 mmHg).

**Le quatrième groupe** est celui des maladies thrombotiques ou thrombo-emboliques qui comporte à la fois l'HTP thrombo-embolique chronique due à la formation et à la non résorption d'un caillot situé dans les artères pulmonaires proximales. Dans cette forme d'HTP, les patients peuvent bénéficier d'une endartériectomie pulmonaire. Par ailleurs, les séquestres et embolies plus périphériques sont souvent indifférenciables des lésions thrombotiques observées dans l'HTAPi, et qui peuvent bénéficier d'une thérapie vasodilatatrice pulmonaire chronique. Dans tous les cas, un traitement anticoagulant à vie est indiqué.

**Le cinquième groupe** regroupe toutes les formes d'HTP avec une composante inflammatoire majeure ou d'une obstruction mécanique (schistosomiase, sarcoïdose). L'hémangiomatose capillaire pulmonaire a également été incluse dans ce groupe, bien que généralement, elle se présente cliniquement comme la maladie pulmonaire veino-occlusive.

|  |
|--|
| <p><b>1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Idiopathique</li> <li>▪ Héritable : <ul style="list-style-type: none"> <li>- mutation <i>BMPR2</i></li> <li>- autres mutations</li> </ul> </li> <li>▪ Induite par des médicaments ou des toxiques</li> <li>▪ Associée à : <ul style="list-style-type: none"> <li>- une connectivite</li> <li>- une infection par le VIH</li> <li>- une hypertension portale</li> <li>- une cardiopathie congénitale</li> <li>- des schistosomiasis</li> </ul> </li> </ul> <p><b>1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) et/ou hémangiomasose capillaire pulmonaire (HCP)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Idiopathique</li> <li>▪ Héritable : <ul style="list-style-type: none"> <li>- mutations <i>EIF2AK4</i></li> <li>- autres mutations</li> </ul> </li> <li>▪ Induite par des médicaments, des toxiques ou les radiations</li> <li>▪ Associée à : <ul style="list-style-type: none"> <li>- une connectivite</li> <li>- une infection par le VIH</li> </ul> </li> </ul> <p><b>1". Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né</b></p> |
| <p><b>2. HTP des cardiopathies gauches</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dysfonction ventriculaire gauche systolique</li> <li>▪ Dysfonction ventriculaire gauche diastolique</li> <li>▪ Valvulopathies</li> <li>▪ Cardiomyopathies obstructives congénitales ou acquises</li> <li>▪ Sténoses des veines pulmonaires, congénitales ou acquises</li> </ul>  |
| <p><b>3. HTP des maladies respiratoires et/ou associées à une hypoxie chronique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)</li> <li>▪ Pneumopathies interstitielles</li> <li>▪ Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives</li> <li>▪ Syndromes d'apnées du sommeil</li> <li>▪ Syndromes d'hypoventilation alvéolaire</li> <li>▪ Exposition chronique à l'altitude</li> <li>▪ Anomalies du développement pulmonaire</li> </ul>  |
| <p><b>4. HTP thromboembolique chronique et autres obstructions artérielles pulmonaires</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ HTP thromboembolique chronique</li> <li>▪ Autres obstructions artérielles pulmonaires : <ul style="list-style-type: none"> <li>- angiosarcome</li> <li>- autres tumeurs intravasculaires</li> <li>- artérites</li> <li>- sténoses congénitales des artères pulmonaires</li> <li>- parasites (hydatidose)</li> </ul> </li> </ul>  |
| <p><b>5. HTP de mécanismes multifactoriels ou incertains</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Maladies hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie</li> <li>▪ Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioleiomyomatose, neurofibromatose</li> <li>▪ Maladies métaboliques : glycogénoses, maladie de Gaucher, dysthyroïdies</li> <li>▪ Autres : microangiopathies thrombotiques pulmonaires tumorales, médiastinites fibreuses, insuffisance rénale chronique (avec ou sans dialyse), HTP segmentaire</li> </ul>   |

Figure 2 : Classification des Hypertensions Pulmonaires (Simonneau et al., 2013)

## Chapitre 2 : L'hypertension pulmonaire post-embolique

### I. Définition et épidémiologie de l'HPPE

L'HPPE est une pathologie rare qui se caractérise par l'organisation et la persistance de caillots fibreux au sein des artères pulmonaires (Alias et al., 2014). Une des particularités de ce sous-type d'HTP est qu'il existe un traitement curatif permettant d'éviter la transplantation pulmonaire. Il s'agit de l'endartériectomie pulmonaire, cette approche chirurgicale consiste à désobstruer les artères atteintes après extraction du séquestre (Dartevelle et al., 2004a).

La prévalence précise et l'incidence annuelle de l'HPPE est sous-évaluée (Condliffe et al., 2009). En effet, Pengo montre que le risque de développer une HPPE après un épisode d'embolie pulmonaire aiguë symptomatique est de 3,7% (Pengo et al., 2004). Guérin et son équipe rapportent une prévalence de 4,8% après un délai médian de 26 mois (Guérin et al., 2014). Aux Etats-Unis, 500 à 2500 patients par an souffriraient d'HPPE. Au Royaume-Uni, l'incidence annuelle est estimée à 5 cas par million d'habitants. Compte-tenu de ces informations, l'HPPE est une des formes les plus courantes d'HTP pré-capillaire. Toutefois, il n'y aurait que 1,7 cas par million d'habitants qui subiraient une endartériectomie pulmonaire en Europe contre 0,9 cas aux Etats-Unis, ce qui suggère que la maladie reste nettement sous-diagnostiquée.

L'étiologie précise de cette maladie reste encore mal définie mais celle qui est la plus communément admise est l'embolie pulmonaire aiguë ou récidivante. Les symptômes de l'HPPE ne sont pas spécifiques (Fedullo et al., 2001). Le symptôme principal est la dyspnée qui est quantifiée selon les stades de la « New York Heart Association » (NYHA) qui est également un facteur pronostic de survie. Malheureusement, la maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé. Comme toute HTP sévère, cette maladie évolue spontanément vers une insuffisance cardiaque droite pouvant engendrer la mort du patient (Vlahakes et al., 1981) (Watts et al., 2010) (Aguero et al., 2014) (Guihaire et al., 2014).

L'HPPE est définie comme une HTP pré-capillaire avec des défauts perfusionnels pulmonaires. Elle doit présenter les critères diagnostics hémodynamiques spécifiques tel qu'une PAPm supérieure ou égale à 25 mmHg au repos, une pression capillaire pulmonaire inférieure ou égale à 15 mmHg et un débit cardiaque normal ou abaissé.

Cette maladie survient aussi bien chez les hommes que chez les femmes (ratio de 1), alors que celui-ci diffère pour les autres formes d'hypertension pulmonaire (Badesch et al., 2010). En Espagne, on recense 3,2 cas par millions d'habitants (Escribano-Subias et al., 2012). En France, l'incidence annuelle est évaluée entre 150 et 350 nouveaux cas d'HPPE.

Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge et le traitement de l'HTP, le pronostic de l'HPPE non traitée reste médiocre. En effet, la cohorte historique des patients traités par anticoagulants seuls rapportée par Riedel en 1982 montrait un taux de survie de l'ordre de 50% à 5 ans lorsque la PAPm initiale était de 30 à 40 mmHg, et de l'ordre de 20 % à 5 ans lorsque la PAPm initiale était supérieure à 50 mmHg (Riedel et al., 1982).

## II. Signes cliniques, diagnostic et suivi de l'HPPE

### 1. Signes cliniques

Les signes cliniques de l'HPPE ne sont pas spécifiques ce qui rend difficile d'établir un diagnostic rapide. Toutefois, le symptôme principal observé chez ces patients est la dyspnée qui est estimée selon les stades de la NYHA. Ce symptôme est commun à beaucoup d'autres formes de pathologies cardio-pulmonaires comme l'HTAP et l'insuffisance cardiaque.

L'HPPE peut se présenter sous 2 cas de figure :

Celui le plus fréquent, on retrouve 40 à 60% des patients ayant une HPPE souffrant d'une dyspnée d'aggravation progressive qui s'installe sur plusieurs mois voire des années et sans antécédent d'embolie pulmonaire connu (Lang, 2004). Les signes cliniques sont ceux d'une HTAP d'origine indéterminée. Dans un stade avancé de la maladie, des signes d'insuffisance cardiaque droite peuvent être retrouvés.

Dans l'autre cas de figure, une dyspnée apparaît à la suite d'un épisode d'embolie pulmonaire aiguë et va s'aggraver progressivement. D'autres signes cliniques peuvent s'ajouter à la dyspnée comme des douleurs thoraciques, des épisodes de syncopes, des palpitations, des hémoptysies ...

Actuellement, il est donc admis que l'HPPE est une conséquence de la thromboembolie veineuse, toutefois admettre que l'HPPE est une conséquence directe de l'embolie pulmonaire symptomatique reste plus difficile.

## 2. Diagnostic

Dans un premier temps, un interrogatoire est mené pour chercher des antécédents associés à l'HPPE (maladie veineuse thromboembolique, thrombophilie, maladie inflammatoire chronique, chirurgie majeure, cancer, néphropathie glomérulaire, présence de matériel étranger intraveineux comme le port-a-cath, shunt ventriculo-atrial, pacemaker) et pour dresser le tableau clinique des patients (Figure 3) (Herve et al., 2015). Ensuite, la dyspnée est évaluée selon les stades de la NYHA et la capacité d'effort grâce au test de marche de 6 min. Le test de marche de 6 minutes est un test durant lequel les patients devront marcher aussi loin que possible durant 6 minutes. Ce test est fiable dans l'évaluation des capacités à l'exercice des patients souffrant d'HTP. Il permet de déterminer la distance parcourue, ainsi que la fréquence cardiaque et la saturation percutanée en O<sub>2</sub> durant l'effort (Miyamoto et al., 2000).

Devant de tels symptômes, il est nécessaire de réaliser une succession d'examens permettant d'orienter le diagnostic vers une HPPE. En premier lieu, le premier examen réalisé est une radiographie pulmonaire. Celle-ci permettra de mettre en évidence une dilatation de l'AP et des cavités cardiaques droites. Dans un deuxième temps, une échographie cardiaque est réalisée. C'est une méthode non invasive qui permettra de déterminer la pression pulmonaire systolique. Lorsque celle-ci est supérieure à 40 mmHg, le diagnostic s'oriente vers une HTP. Il permet également d'évaluer le degré d'hypertrophie de la paroi du ventricule droit. Ensuite, l'examen à pratiquer est une scintigraphie pulmonaire de perfusion et de ventilation (Tunariu et al., 2007). Cet examen permet de détecter une obstruction artérielle pulmonaire et d'orienter l'origine thrombo-embolique de l'HTP. Puis, les patients sont soumis à un angioscanner thoracique qui permettra de conforter le diagnostic d'HPPE.

Lorsque le diagnostic d'HTP est posé grâce aux examens cités précédemment et que son origine post-embolique est suggérée, le cathétérisme cardiaque droit et l'angiographie ou l'angioscanner pulmonaire sont les examens clés dans la validation du diagnostic.



Le cathétérisme cardiaque droit est la méthode de référence pour le diagnostic d'une hypertension pulmonaire. Cet examen permet également d'éliminer une origine post-capillaire de cette HTP et de déterminer le degré de gravité hémodynamique. Le diagnostic d'HTP sera confirmé si la PAPm est supérieure ou égale à 25 mmHg au repos. L'angiographie pulmonaire est un examen qui est le plus souvent réalisé en même temps que le cathétérisme droit. Cet examen permet de confirmer le diagnostic de la maladie thrombo-embolique pulmonaire chronique, de visualiser et de localiser l'obstruction vasculaire pulmonaire.

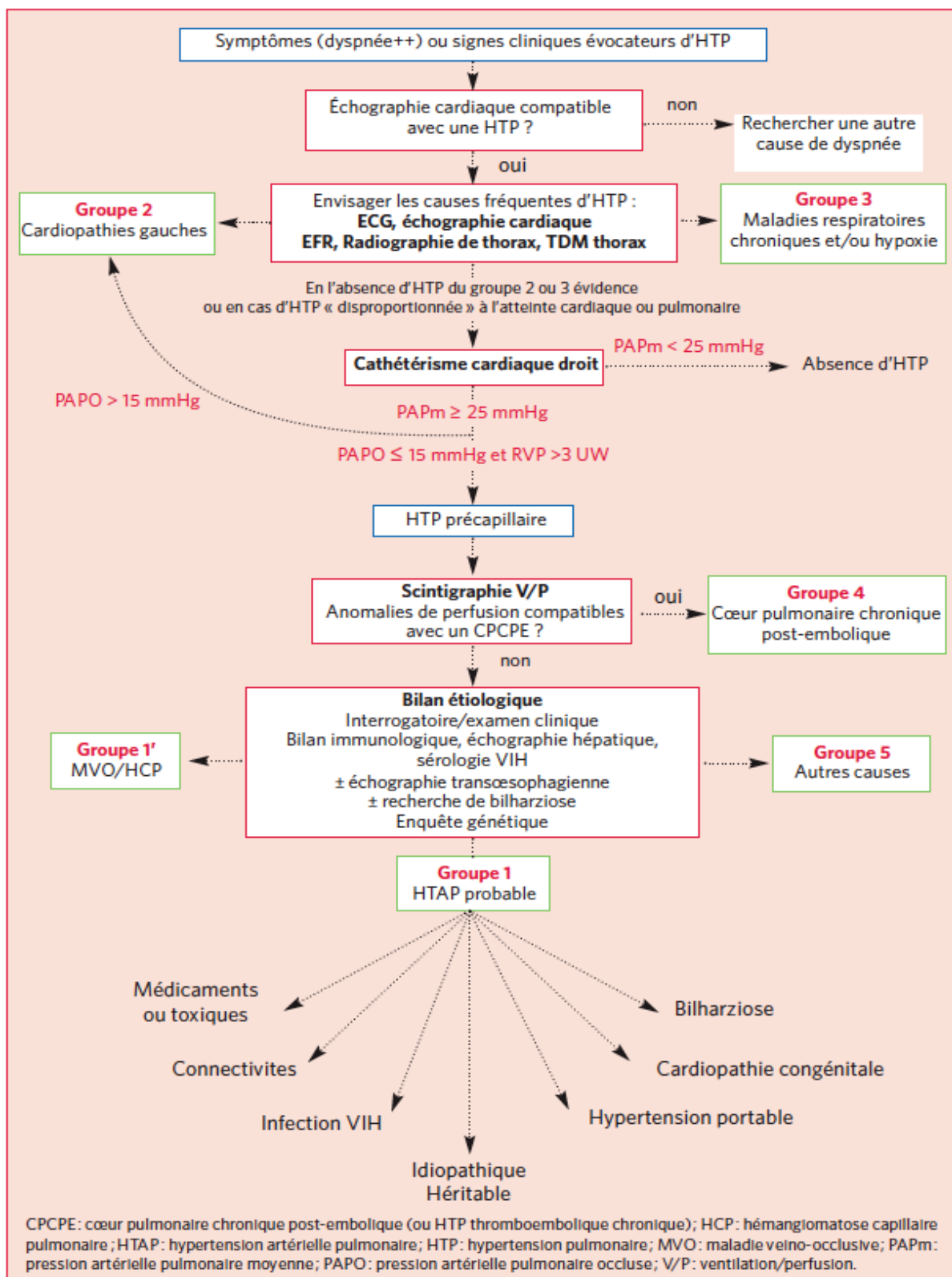


Figure 3 : Algorithme diagnostique devant une suspicion d'HTAP (Hoepfer et al., 2013)

### 3. Suivi de l'HPPE

Afin d'établir une stratégie thérapeutique la plus appropriée possible, il est nécessaire de prendre en compte différents paramètres comme les antécédents du patient, la classe fonctionnelle NYHA, le test de marche de six minutes, les paramètres échographiques et hémodynamiques, le pic de  $VO_2$ , les taux biologiques de certains biomarqueurs (BNP, troponine) et l'apparition d'éventuels signes d'une insuffisance cardiaque droite (Hoepfer et al., 2013) (McLaughlin et al., 2009) (McLaughlin et al., 2011). Tous ces paramètres permettront aux chirurgiens de déterminer la faisabilité chirurgicale d'une désobstruction hémodynamiquement efficace (endartériectomie des artères pulmonaires).

### 4. Formes cliniques particulières

#### 4.1 Hypertension pulmonaire d'effort

L'HTP d'effort se définit par une obstruction vasculaire pulmonaire chronique avec une PAPm inférieure à 25 mmHg au repos mais supérieure à 30 mmHg à l'effort avec un débit cardiaque inférieure à 10 L/min. Ces patients peuvent présenter une dyspnée d'effort. Ils peuvent bénéficier d'une endartériectomie des artères pulmonaires à condition d'effectuer ce geste avec des risques chirurgicaux extrêmement faibles.

#### 4.2 Hypertension pulmonaire aigüe sur HPPE

L'HTP aigüe sur HPPE est l'une des formes les plus sévères d'HPPE. La présence d'une embolie pulmonaire aigüe ou d'une thrombose locale des artères pulmonaires peut aggraver de manière aigüe une HPPE. Leur pression systolique ventriculaire droite est supérieure à 60 mmHg lors d'un épisode d'embolie pulmonaire aigüe. Ces patients vont subir une endartériectomie des artères pulmonaires en urgence.

### III. Classification clinique de l'HPPE

L'utilisation de cette classification des hypertensions pulmonaires a pour objectif d'individualiser des catégories de pathologies présentant des similitudes dans leur physiopathologie, leur présentation clinique et leur prise en charge. Selon la nouvelle classification de Dana Point des hypertensions pulmonaires actualisée à Nice en 2015, l'HPPE correspond au groupe 4. Il s'agit d'une entité nosologique à part entière avec une physiopathologie, des critères anatomo-pathologiques, un diagnostic et un traitement qui lui sont propres (Simonneau et al., 2013).

Tous les critères qui sont propres à l'HPPE, ont permis de la classer dans ce groupe 4 au dernier congrès mondial de l'HTP (Nice 2015). Les lésions histologiques de l'HPPE sont associées à l'organisation d'un séquestre fibreux présent dans la media des artères proximales. Celles-ci remplacent donc l'intima normale et peuvent provoquer une sténose ainsi qu'une vasculopathie distale. Toutes ces données regroupées ont permis aux cliniciens de classer cette pathologie dans une entité qui lui est propre.

## Chapitre 3 : Aspects physiopathologiques

### caractéristiques de l'HPPE

Malgré les progrès de ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'HPPE, celle-ci reste incomprise à ce jour. La principale caractéristique pathologique de l'HPPE est la fibrose chronique du caillot dans l'artère pulmonaire conduisant à une occlusion des artères pulmonaires. Dans des conditions normales, les caillots sanguins formés dans les artères pulmonaires sont dissous grâce à un processus en deux phases. La première phase est une fibrinolyse, suivie d'une seconde phase cellulaire effectuée par les monocytes et les progéniteurs endothéliaux qui induisent une recanalisation et une néovascularisation des séquestres. Les mécanismes défectueux de ce processus qui conduisent à l'HPPE sont encore flous. Cependant, des études récentes ont mises en cause la dysfonction endothéliale et l'inflammation dans la pathogenèse de l'HPPE. Dans un modèle de souris, Alias et ses collègues ont montré que la non-résolution du séquestre est due à un défaut du processus d'angiogenèse (Alias et al., 2014). Sakao et son équipe ont montré que les myofibroblastes isolés à partir de prélèvements obtenus par endartériectomie pulmonaire peuvent induire une dysfonction des cellules endothéliales (Sakao et al., 2011).

En dehors de la cellule endothéliale qui semble être l'initiateur de la non résorption du séquestre, d'autres types cellulaires semblent intervenir à différents degrés dans l'organisation du séquestre tel que les monocytes, les plaquettes, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires.

Contrairement aux autres formes d'HTP, les lésions histologiques dans l'HPPE sont différentes en fonction des zones étudiées. En effet, on retrouve tout d'abord une vasculopathie dite post-obstructive en aval des obstructions artérielles pulmonaires et des embolies fibrino-cruoriques distaux. On observe également en aval de l'obstruction vasculaire pulmonaire, un remodelage des artères pulmonaires associé à une hypervascularisation systémique de suppléance pouvant jouer un rôle dans l'élévation de la résistance vasculaire pulmonaire caractérisant l'HTP.

La cellule endothéliale constitue un rempart entre la circulation sanguine et les cellules musculaires lisses vasculaires. Il paraît être essentiel dans la compréhension de la

physiopathologie de l'HPPE puisqu'elle est à la fois au contact de la lumière vasculaire (siège d'une thrombose ou d'un hyper-débit) et de la cellule musculaire lisse (CML).

Les cellules endothéliales sont au centre de la physiopathologie de l'HPPE puisque c'est au contact de l'endothélium pulmonaire que le séquestre s'organise et ne se lyse pas. Aux Etats-Unis, Moser montre que la vasculopathie distale des zones non obstruées présente certaines similitudes aux lésions connues dans l'HTAP primitive associant une hypertrophie de la paroi artérielle et une dysfonction des cellules endothéliales (Moser and Bloor, 1993).

L'inflammation pourrait aussi induire une dysfonction endothéliale et une perturbation de la relation CE-CML pouvant aboutir au remodelage vasculaire et à l'absence de lyse du caillot.

Par ailleurs, un grand nombre de molécules sont impliquées dans la pathogenèse de l'HPPE. En effet, une production altérée de divers médiateurs vasoactifs endothéliaux (la prostacycline, l'endothéline-1...), cytokines inflammatoires, de nombreux facteurs de croissance sont identifiés dans l'HPPE. L'altération de ces divers médiateurs affecte l'hémodynamique vasculaire pulmonaire par modulation du tonus et du remodelage vasculaire.

L'étude physiopathologique de l'HPPE comporte deux axes de recherche : l'étude des mécanismes de la formation et de la non-résorption du séquestre pulmonaire et l'étude des mécanismes physiopathologiques aboutissant au développement d'une vasculopathie pulmonaire distale. Les CE et les CML pulmonaires et leurs relations paraissent être au centre de la physiopathologie de cette maladie.

## I. Anomalies morphologiques

L'HPPE est caractérisée par l'organisation et la persistance de caillots fibrino-cruoriques provoquant une élévation des résistances vasculaires pulmonaires. Le séquestre est formé par un dépôt de collagène, la pénétration de myofibroblastes, de cellules musculaires lisses de la media de l'AP au niveau de la couche élastique interne, l'endothélium et des cellules inflammatoires comme des macrophages et des lymphocytes (Wagenvoort, 1995) (Anderson et al., 1973).

Le séquestre évolue alors progressivement vers une structure de tissu conjonctif de plus en plus fibreux. Les embolies pulmonaires massives peuvent être responsables d'infarctus pulmonaire.

L'endothélium capillaire de la zone est généralement déficient et perméable de telle sorte que le tissu pulmonaire devienne hémorragique (Charan et Carvalho, 1997) (Michel et Hakim, 1991).

En 1993, Moser fut le premier à émettre l'hypothèse du double compartiment vasculaire pulmonaire : une obstruction vasculaire pulmonaire et la microvasculopathie (Dorfmueller et al., 2014) (Boulate et al., 2015).

La première est celle de l'HPPE chronique (obstruction vasculaire pulmonaire) avec un séquestre localisé au niveau des gros troncs artériels (Figure 4). Les séquestres observés sont plus ou moins frais, oblitérant la lumière de l'artère pulmonaire. Ces séquestres s'organisent au sein de la paroi sous forme de zones de fibrose intimale excentrée. Une revascularisation de ces séquestres est observée.

La deuxième est celle de l'HPPE distale (ou microvasculopathie) (Figure 5). Les séquestres présentent des embolies périphériques qui se revascularisent. Il s'agit de lésions vasculaires pulmonaires distales à type d'épaississement de la media (Morris et al., 2006).

L'obstacle vasculaire pulmonaire représenté par l'organisation fibreuse du caillot ne peut pas expliquer à lui seul l'élévation des résistances artérielles pulmonaires (Fadel et al., 2004).

Au cours de l'évolution naturelle de la maladie, il existe une période dite de « lune de miel » durant laquelle les résistances artérielles pulmonaires s'élèvent progressivement en dehors de tout nouvel épisode embolique (Piazza et Goldhaber, 2011).

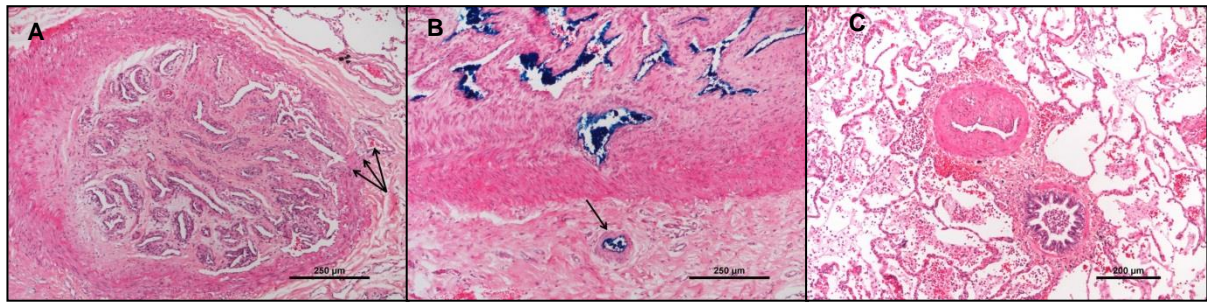
Malgré une bonne désobstruction chirurgicale, les RPT restent élevées chez 30% des patients opérés pour se normaliser durant l'année qui suit le geste chirurgical.

Des études anatomo-pathologiques de poumons d'HPPE ont montré qu'en plus des lésions d'obstruction vasculaire par du séquestre organisé, il existait un remodelage vasculaire pulmonaire distal similaire à celui d'autres formes d'HTAP associant des lésions pulmonaires et un remaniement hypertrophique de la paroi des artérioles pulmonaires (Moser and Bloor, 1993).

Ainsi, bien que l'embolie pulmonaire et la non-résorption du caillot soient les événements initiaux de la maladie, le remodelage microvasculaire pulmonaire est responsable d'une partie non négligeable de l'élévation des RPT (Moser et Bloor, 1993). Ce remodelage vasculaire pulmonaire existe dans les territoires vasculaires pulmonaires non obstrués lesquels sont soumis au début de la maladie à un hyper-débit relatif secondaire à la redistribution du débit cardiaque encore

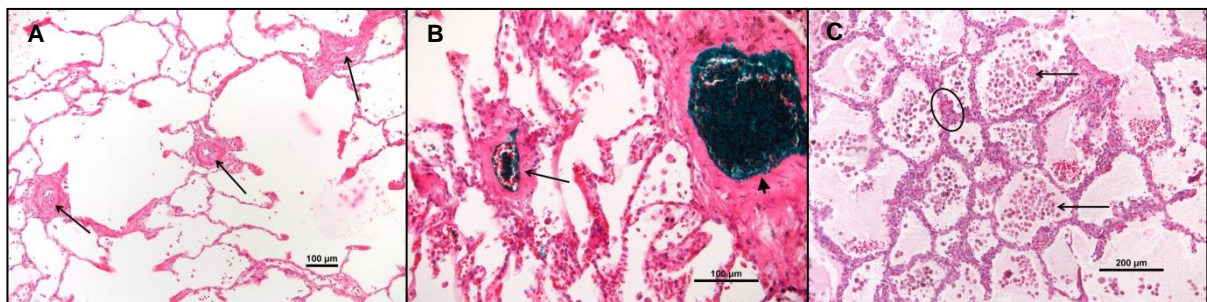
conservé. Des études expérimentales et cliniques ont démontré le rôle de l'hyperdébit pulmonaire dans la formation de ce remodelage microvasculaire pulmonaire similaire à celui des cardiopathies congénitales avec shunt gauche-droit. L'hypothèse la plus probable est une dysfonction de la cellule endothéliale. En effet, lorsque l'endothélium est altéré, les lésions thrombotiques apparaissent. Les médiateurs comme le monoxyde d'azote (NO) confère à la cellule endothéliale une importante activité anti-thrombotique en inhibant l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire (Long et Rubin, 1987) (Michael et Markewitz, 1996). Il inhibe la croissance des cellules musculaires lisses et stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Loscalzo, 1995). D'autres médiateurs comme les prostaglandines possèdent également une action anti-agrégante des plaquettes.





**Figure 4 : Histologie de poumons de patients atteints d'HPPE : obstruction vasculaire pulmonaire (Lang et al., 2016)**

Coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) A: artère pulmonaire (niveau segmentaire) montrant l'occlusion : un séquestre organisé; à noter l'angiogenèse au sein de l'occlusion avec formation de néovaisseaux (flèches). B: Artère élastique cette fois, le hile des artères bronchiques ont été injectés avec un colorant bleu: le colorant peut être perçue au sein des vasa vasorum (flèche) et dans plusieurs néovaisseaux, ce qui suggère une origine systémique de ce dernier. C: Fibrose intimale excentrique d'une petite artère pulmonaire généralement vu dans l'HPPE.



**Figure 5 : Histologie pulmonaire de patients HPPE : microvasculopathie. (Lang et al., 2016)**

Coloration HES A: Microvasculopathie avec remodelage important de vaisseaux pulmonaires <100  $\mu\text{m}$  (artérioles ou veinules) (flèches). B: Après injection d'un colorant vert dans les veines du hile, mise en évidence non seulement des veines du septum (tête de flèche à droite), mais aussi de petites veinules remodelées (flèche gauche) ce qui suggère l'implication des vaisseaux post-capillaires dans la maladie microvasculaire. C: Les zones avec épaissement de la paroi alvéolaire sont fréquemment présents dans les territoires occlus; parois alvéolaires comportent de multiples couches de capillaires (cercle) comme on le voit dans l'hémangiomatose capillaire ou dans la maladie veino-occlusive pulmonaire; A noter l'oedème et de nombreux macrophages dans les alvéoles (flèches).

## II. Mécanismes cellulaires

### 1. L'endothélium du poumon normal

L'endothélium est une couche monocellulaire faisant guise d'interface entre le compartiment intravasculaire et le compartiment extravasculaire. Il contrôle le passage du plasma et des cellules depuis l'espace vasculaire vers le compartiment extravasculaire.

Les CE se caractérisent par une grande hétérogénéité structurelle. En effet, les CE présentent de nombreuses particularités variant selon les types de vaisseaux dans la vascularisation pulmonaire. L'endothélium possède plusieurs rôles tel que le maintien d'une surface non-thrombogène, la régulation de l'angiogénèse, le rôle de barrière entre le sang et les tissus adjacents aux vaisseaux sanguins, la production de facteurs de croissance et de signaux cellulaires aux activités autocrines et paracrines ainsi qu'une fonction régulatrice du tonus vasomoteur des vaisseaux. La régulation du tonus vasculaire se manifeste par la sécrétion des médiateurs influençant l'hémodynamique vasculaire. En effet, l'endothélium contribue à la régulation de la pression artérielle et du flux sanguin en synthétisant et libérant des substances vasodilatatrices tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), ainsi que des substances vasoconstrictrices telles que l'endothéline et l'angiotensine II. L'équilibre de ces sécrétions détermine le tonus vasculaire.

En situation pathologique, les cellules endothéliales expriment également des molécules d'adhésion telles que la E-sélectine et la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 impliqués dans les processus d'inflammation (Budhiraja et al., 2004).

### 2. L'endothélium dans l'HPPE

#### 2.1 Phénotype

Une recanalisation partielle des artères pulmonaires et une formation de nouveaux vaisseaux sanguins « endothélialisés » peuvent être trouvées dans la partie distale à l'intérieur du caillot fibreux dans l'HPPE (Yao et al., 2009 ; Lang et al., 1994). Les systèmes vasculaires sont capables de former des ramifications. La formation de nouveaux vaisseaux est régulée par un équilibre local de facteurs pro et anti-angiogéniques (Ribatti et al., 2009). Dans certaines

conditions, telles que la formation de tumeurs ou la cicatrisation des plaies, les régulateurs positifs de l'angiogenèse prédominent. Les cellules endothéliales prolifèrent, migrent et forment un vaisseau, qui est finalement stabilisée par des péricytes et des cellules musculaires lisses (Distler et al., 2003). Cependant, l'angiogenèse dans les artères pulmonaires dépend des vasa vasorum provenant des artères bronchiques systémiques. Après l'occlusion de l'artère pulmonaire, ces vaisseaux collatéraux se multiplient dans les artères pulmonaires. Chez les patients souffrant d'HPPE, le nombre de vasa vasorum adventiciel pulmonaire augmente et le noyau des séquestres non résolus est recanalisé par des structures néovasculaires endothélialisés provenant des vasa vasorum (Kimura et al., 2001). Si les facteurs angiostatiques (angiostatine, endostatine, thrombospondine, chimiokines) l'emportent sur les molécules angiogéniques tels que le VEGF, FGF, angiopoïétines ou intégrines, l'angiogenèse ne peut se produire (Carmeliet et al., 2000). De nombreux facteurs de croissance solubles et des inhibiteurs, des cytokines, des protéases ainsi que des protéines de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion contrôlent étroitement ce processus en plusieurs étapes. Toutes ces molécules sont sécrétées et régulées par les cellules endothéliales.

## 2.2 Les cellules endothéliales circulantes

Parmi les sous-populations de cellules endothéliales, les formes circulantes (CECs) qui ont la particularité de se détacher de la paroi vasculaire lors de situations pathologiques. En effet, ces dernières participent à différents processus tel que la réparation en réponse à une lésion vasculaire, lors de la genèse de tumeur par exemple. Les CECs se définissent par un certain nombre de critères morphologiques phénotypiques et fonctionnels, leur permettant de se différencier notamment des progéniteurs endothéliaux circulants (Dignat-George et al., 2003). Définies comme étant des cellules endothéliales matures, les CEC expriment le marqueur CD36 permettant de discriminer les micro-vaisseaux des vaisseaux de gros calibres et se caractérisent par l'expression des marqueurs ICAM-1, de la E-sélectine et de la P-sélectine. Une élévation de leur nombre a été rapportée dans les situations pathologiques associées à une altération endothéliale (Woywodt et al., 2003). Cependant, le rôle pathobiologique des CEC dans l'HPPE reste à élucider.

### 3. Cellules musculaires lisses, fibroblastes et myofibroblastes

L'HPPE se caractérise par des lésions obstructives de l'intima, montrant essentiellement un phénotype myofibroblastique et un degré variable de différenciation des cellules endothéliales (Yi et al., 2000). Les séquestres des patients souffrant d'HPPE contiennent des CML, des fibroblastes et des myofibroblastes (Blauwet et al., 2003).

Les myofibroblastes sont des cellules ubiquitaires avec des caractéristiques à la fois des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Ils participent à la cicatrisation des plaies et de la réponse inflammatoire. Ils ont la capacité de produire une matrice extracellulaire (MEC). Leur activation excessive et leur inhibition à l'apoptose peuvent être le processus sous-jacent à de nombreuses maladies fibrotiques (Hinz et al., 2007).

Les myofibroblastes montrent une hyperprolifération et une capacité d'envahissement.

En général, après une lésion de l'intima et la formation de séquestre, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes contractiles et sécrétoires qui contribuent à la réparation des tissus au cours de la cicatrisation. Pour terminer le processus de réparation de l'intima, la MEC une fois reconstruite reprend son action et les myofibroblastes disparaissent par apoptose massive (Tomasek et al., 2002).

Les myofibroblastes peuvent nuire gravement à la fonction d'organe lors de la contraction et de la sécrétion des protéines de la MEC lorsque celles-ci deviennent excessive comme dans la fibrose pulmonaire (Thannickal et al., 2004), la fibrose du foie (Desmoulière et al., 2003) et au cours de la formation de plaques d'athérosclérose et de lésions de resténose (Zalewski et al., 2002 ; Hao et al., 2006).

En effet, Firth et al. ont récemment rapporté la présence de cellules souches mésenchymateuses multipotentes dans les tissus des patients atteints d'HPPE (Firth et al., 2010). Ces études ont suggéré que le microenvironnement unique créé par le caillot fibreux peut promouvoir ces cellules progénitrices, de se différencier et d'améliorer le remodelage de l'intima (Yao et al., 2009).

#### 4. Le stimulus initial

L'activation endothéliale est potentiellement déclenchée par un grand nombre de stimuli, comme les forces de cisaillement d'un flux sanguin pulmonaire accru, une infection virale, une hypoxie alvéolaire, l'inflammation, ou encore la réponse à des drogues ou des toxines. Ces agressions induisent une lésion endothéliale dont le mécanisme est mal connu. Une fois installée, cette lésion endothéliale conduit à l'apoptose des cellules habituellement quiescentes, à la déstabilisation de l'intima vasculaire pulmonaire et à la prolifération incontrôlée des CE. Il s'en suit une diminution de la lumière vasculaire déclenchant une élévation de la résistance et de la pression vasculaire pulmonaire. Par ailleurs, il est possible que cette lésion endothéliale engendre la fuite de médiateurs prolifératifs tels que des facteurs de croissance comme le FGF-2.

De plus, l'hypertrophie adaptative du muscle lisse vasculaire et de l'adventice peut se produire en réponse à l'augmentation de la pression endo-luminale. On assisterait donc au remodelage des artères pulmonaires (Budhiraja et al., 2004).

### III. Mécanismes moléculaires

Quels sont les molécules qui semblent être impliquées dans la physiopathologie de l'HPPE ?

#### 1. Les médiateurs vasoactifs

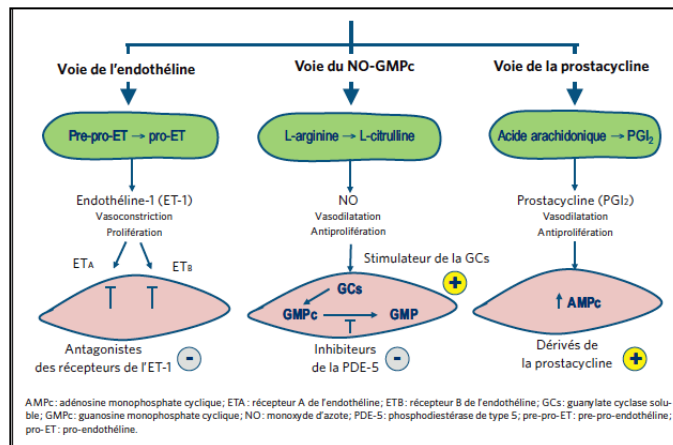


Figure 6 : Voies des différents médiateurs vasoactifs de la cellule endothéliale (Sitbon, 2015)

L'endothélium sécrète divers facteurs de croissance et des médiateurs vasoactifs influençant l'hémodynamique vasculaire et affectant la contractilité vasculaire et la croissance cellulaire.

Chez un individu sain, la balance entre ces médiateurs est stabilisée, conduisant à un faible tonus basal des vaisseaux pulmonaires, une homéostasie et une réparation des lésions vasculaires.

Lors de l'altération de l'équilibre vasodilatation/vasoconstriction, toutes les propriétés des vaisseaux pulmonaires sont altérées. Ainsi, une diminution de vasodilatateurs (NO et prostacycline) et à contrario, une augmentation de l'expression de vasoconstricteurs (endothéline-1), affecte non seulement le tonus vasculaire mais favorise également la prolifération et le remodelage (Figure 6).

#### 1.1 Oxyde Nitrique

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique ou NO) est le principal vasodilatateur produit par l'endothélium vasculaire et l'épithélium des voies aériennes (Bohle et al., 2000) (German et al., 2000). Sa production contribue à la vasodilatation dite endothélium-dépendante. En plus de son action vasorelaxante, le NO inhibe la prolifération musculaire lisse et l'agrégation plaquettaire et régule la baisse de production de l'ET-1.

Le NO est produit par la conversion de la L-arginine en L-citrulline en présence de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), une réaction catalysée par la NO synthase (NOS) (Michelakis, 2003). Cette enzyme existe sous 3 formes : la NOS endothéliale (NOSe) présente dans la CE, produisant de petites quantités de NO. La NOS inductible (NOSi) produit de grandes quantités de NO lors d'un processus inflammatoire lorsqu'elle est stimulée par l'interleukine 1 ou le Tumor Necrosing Factor alpha (TNF $\alpha$ ). La troisième isoforme est neuronale (NOSn) et constitutive. La CE sécrète du NO seulement après une cascade d'activation stimulée par des facteurs physiques ou chimiques. Les forces de cisaillement causées par l'augmentation du flux sanguin pulmonaire dans les vaisseaux sont le facteur principal qui régit la production locale de NO (Kone et Higham, 1999). Une fois produit par la CE, le NO se diffuse dans les tissus adjacents dont les CML et permet l'activation de la guanylate cyclase, conduisant ainsi à la formation du guanosine monophosphate cyclique (GMPc), (Arnold et al., 1977) ce qui entraîne la relaxation des CML.

Le rôle hypothétique du déficit en NO endothélial conduisant à l'HPPE est renforcé par les effets bénéfiques du NO inhalé et des donneurs de NO tels que la L-arginine chez les patients atteints d'HPPE. Une nouvelle stratégie thérapeutique vise à augmenter la vasodilatation pulmonaire par la voie du GMPc-NO dépendante, par inhibition des phosphodiésterases de type 5 (enzymes qui dégradent le GMPc). Le Sildénafil, inhibiteur de la PDE-5, s'est avéré efficace et sans danger dans les essais réalisés chez des patients souffrant d'HPPE.

## 1.2 Prostacycline

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est un puissant vasodilatateur endogène aussi bien dans la circulation systémique que dans la circulation pulmonaire. Elle est synthétisée par la cyclo-oxygénase via la voie de l'acide arachidonique dans l'endothélium vasculaire et les muscles lisses. Elle a pour vocation d'agir par le biais de l'activation de voies dépendantes de l'AMPc (Tuder et al., 1999). En plus de son effet vasodilatateur, la prostacycline diminue l'agrégation plaquettaire et inhibe la prolifération des CML (Falcetti et al., 2010).

Bien que la prostacycline puisse ne pas contribuer au maintien de tonus vasculaire pulmonaire basal, elle protège contre la vasoconstriction pulmonaire et le remodelage en réponse à divers stimuli. Cabrol et ses collaborateurs ont démontré que la prostacycline joue un rôle majeur dans

la réponse vasculaire pulmonaire en condition d'hypoxie chronique. En effet, plusieurs essais ont montré une amélioration des capacités à l'exercice, des paramètres hémodynamiques cardio-pulmonaires, de la classe fonctionnelle de la NYHA, des symptômes et de la survie des patients atteints d'HPPE traités par perfusion continue de prostacycline intra-veineuse (époprosténol) dans l'HPPE (Cabrol et al., 2007).

### 1.3 L'endothéline-1 = ET-1

L'endothéline est impliquée dans diverses anomalies vasculaires dont l'HPPE. L'endothéline représente une famille de 4 polypeptides : ET-1, ET-2, ET-3 et ET-4 dont l'ET-1 est l'isoforme pré-dominante. Sa structure est caractérisée par la présence de deux ponts disulfures intra-chaîne qui est nécessaire au maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule et d'une extrémité carboxy terminale essentielle à l'activité pharmacologique. L'expression au sein de l'endothélium des peptides ET-1, ET-2 et ET-3 est stimulée par de nombreux agents chimiques (noradrénaline, angiotensine II, thrombine), physiques (force de cisaillement) ou par l'hypoxie.

L'endothéline-1 (ET-1) découverte en 1988, est un peptide de 21 acides aminés avec une activité vasoconstrictrice puissante possédant des propriétés agrégantes plaquettaires et mitogènes. L'endothéline-1 est très présente dans l'endothélium vasculaire. Elle a un rôle fondamental dans la régulation de la pression sanguine dans les conditions physiologiques normales. En plus de son action vasoconstrictrice, l'ET-1 possède une action mitogène sur le muscle lisse, stimulant la synthèse de collagène (à l'origine de la fibrose) et favorisant l'inflammation. L'ET-1 est principalement synthétisée par les CE des vaisseaux sanguins et par les CML. Dans l'endothélium, elle est libérée de la lumière vers le muscle lisse vasculaire, suggérant une action paracrine. L'ET-1 est également produite par d'autres cellules impliquées dans la maladie vasculaire comme les leucocytes, les macrophages, les cardiomyocytes et les cellules mésangiales (Lüscher et Barton, 2000).

Deux voies de sécrétion distinctes pour le transport et la libération de l'ET-1 ont été proposées. L'ET-1 est transportée et libérée à partir de vésicules sécrétoires par l'intermédiaire d'une voie constitutive indépendante de l'AMPc (Benigni, 2000). L'ET-1 est également stockée dans les corps de Weibel-Palade et libérée à la surface de la cellule par des stimuli appropriés (Russell et Molenaar, 2000). Chez les mammifères, l'ET-1 agit de façon paracrine sur 2 types de récepteurs



à l'endothéline, couplés à une protéine G. Chacun de ces 2 récepteurs possède une localisation et une affinité pour les peptides de l'ET-1 bien spécifiques : le récepteur ET-A médiateur de l'effet vasoconstricteur du peptide et le récepteur ET-B dont l'activation peut induire une vasoconstriction lorsqu'il est présent à la surface des cellules musculaires lisses ou vasodilatation suite à l'activation des ET-B localisés à la surface des cellules endothéliales suite à la synthèse du NO et de la PGI<sub>2</sub> (Sato et al., 1995) (Nicaud et al., 1999) par son action sur les CE.

De plus, une augmentation significative de l'expression du gène du récepteur ETB a été rapportée dans les HTAP thrombo-emboliques sévères à la fois chez l'animal (Kim et al., 2000a) et chez l'Homme (Bauer et al., 2002). De nombreux patients atteints d'HTAP thrombo-embolique présentent en plus une vasculopathie des petits vaisseaux, limitant l'amélioration hémodynamique après thrombo-endartériectomie pulmonaire. Ceci suggère une certaine implication de l'ET-1 dans le processus de développement de la maladie.

## 2. Les médiateurs de l'inflammation

L'inflammation se définit comme est un ensemble de réactions (entre les facteurs solubles et les cellules) générées par l'organisme en réponse à une agression subite (traumatismes, infections, accidents toxiques, agression auto-immune). L'inflammation systémique semble jouer un rôle prépondérant dans l'HPPE (Bonderman et al., 2009). De nombreux infiltrats de cellules inflammatoires comme des lymphocytes B (Figure 7A), des lymphocytes T (Figure 7B), des macrophages (Figure 7C) et des neutrophiles (Figure 7D) sont retrouvés au sein des séquestres (Arbustini et al., 2002; Blauwet et al., 2003).

Il est bien admis que les médiateurs inflammatoires sont impliqués dans le développement et la progression de la maladie (Groth et al., 2014; Kherbeck et al., 2013; Price et al., 2012). En effet, une augmentation accrue de différentes cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10) (Soon et al., 2010), de chimiokines (MCP-1) (Kimura et al., 2001) et de la protéine C réactive CRP (Quarck et al., 2009).

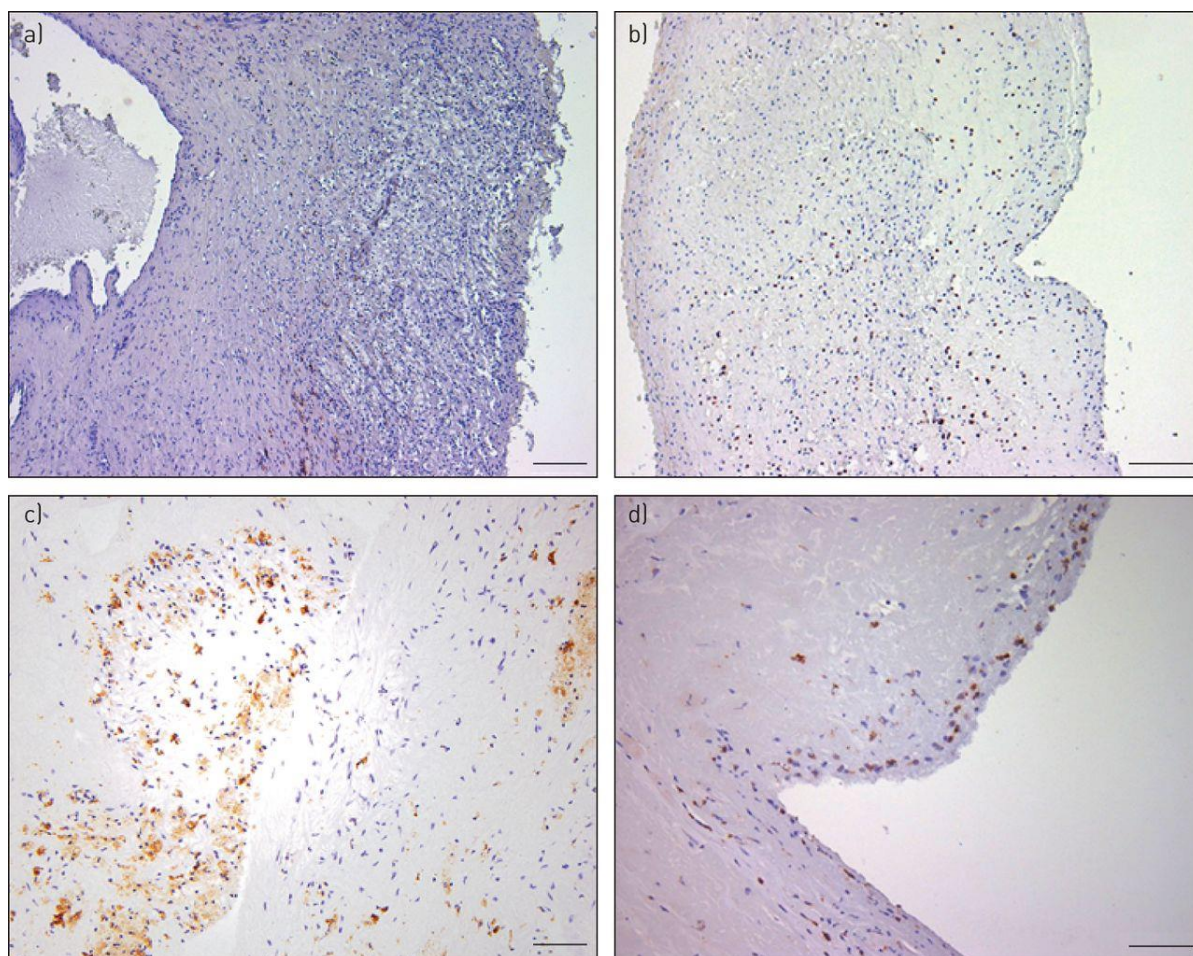


Figure 7 : Infiltrats inflammatoires dans le séquestre de patients ayant une HPPE (Quarck et al., 2015)

## 2.1 Les interleukines : IL-1 $\beta$ et IL-6

Les interleukines (IL) sont des cytokines, autrement dit des protéines naturelles présentes dans chaque organisme. Les interleukines sont produites mais aussi utilisées par le système immunitaire.

L'interleukine-1 (IL-1) appartient à la famille des cytokines pro-inflammatoires. Il s'agit d'un important médiateur de réactions immunitaires innées. En effet, elle est produite lors de processus de défense de l'organisme. Elle intervient dans l'activation des lymphocytes, la synthèse des protéines de l'inflammation, les phénomènes de dégradation du cartilage et de la résorption osseuse, la synthèse des prostaglandines et l'hématopoïèse. L'IL-1 existe sous deux formes : IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (sa forme principale). IL-1 $\beta$  est impliquée dans de nombreuses cascades de signalisation. Les deux formes d'IL-1 se lient au même récepteur, lequel est composé de deux sous-unités apparentées mais non identiques, qui transmettent des signaux intracellulaires. La stimulation du récepteur entraîne la sécrétion ou la synthèse de plusieurs médiateurs inflammatoires. Il existe un antagoniste endogène au récepteur de l'IL-1, l'IL-1Ra, qui à la particularité de se lier au même récepteur membranaire que l'IL-1, empêchant notamment l'envoi de son signal à la cellule, s'opposant par conséquent aux manifestations de type inflammatoire. (Weber et al., 2010).

L'IL-6 est une glycoprotéine sécrétée par les monocytes, les CE, les lymphocytes T et B, les fibroblastes. Sa concentration plasmatique s'élève au cours des chocs septiques et de diverses agressions (traumatismes, brûlures). Elle stimule la croissance et la différenciation des lymphocytes B et augmente la génération des plaquettes. Elle provoque, par activation des hépatocytes, la sécrétion des protéines de l'inflammation comme le fibrinogène et la protéine C réactive. Elle a un rôle pro-inflammatoire et un effet cytotoxique vis-à-vis de certaines tumeurs. Elle peut agir localement ou être acheminée par la circulation sanguine vers ses organes cibles où elle exercera son action via son récepteur (Kamimura et al., 2003).

Toutefois, la production prolongée de quantités relativement élevées d'IL-6 peut affaiblir le système immunitaire à long terme. Cette faiblesse peut se produire parce que les quantités excessives d'IL-6 peuvent causer la mort prématurée des cellules immunitaires, accroître la vulnérabilité du foie aux dommages et augmenter les risques de maladies cardiovasculaires.

Une augmentation des taux circulants d'IL-1, d'IL-6 et d'IL-10 a été constaté chez les patients souffrant d'HPPE (Soon et al., 2010).

De plus, il a été démontré que la surexpression d'IL-6 chez des souris transgéniques serait à l'origine d'un remodelage pulmonaire et par conséquent d'une HTP spontanée (Steiner et al., 2009). L'inactivation du gène codant pour l'IL-6 a un effet protecteur contre l'HTAP hypoxique chez la souris (Savale et al., 2009).

## 2.2 Les chimiokines

Les chimiokines constituent une famille de cytokines chimiotactiques et sont subdivisées en quatre familles sur la base du nombre et de l'espacement des résidus cystéine conservés à l'extrémité N-terminale de la protéine. Elles jouent un rôle majeur dans le recrutement des monocytes, des neutrophiles et des lymphocytes ainsi que dans l'induction de la chimiotaxie par l'activation des récepteurs aux protéines G couplées. En effet, les chimiokines sont sécrétées en réponse à des signaux tels que les cytokines pro-inflammatoires où elles jouent un rôle important dans le recrutement des monocytes, des neutrophiles de manière sélective et des lymphocytes. Ceci provoque la migration des cellules exprimant les récepteurs de chimiokines selon un gradient de ligand chimique connu sous le nom de gradient de chimiokine (Callewaere et al., 2007; Wagner et al., 2008; Xia et Frangogiannis, 2007).

Le MCP (Monocyte chemoattractant protein-1 / CCL2) appartient à une famille composée d'au moins quatre membres (MCP-1, -MCP-2, MCP-3, MCP-4). Le MCP-1 est l'une des chimiokines clé qui régule la migration et l'infiltration des monocytes / macrophages. Il est produit par de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, épithéliales, les fibroblastes, le muscle lisse, les astrocytes, les monocytes et les cellules microgliales (Barna et al., 1994; Brown et al., 1992; Cushing et al., 1990; Standiford et al., 1991).

Une augmentation des taux de cytokines pro-inflammatoires circulantes (IL-1 $\beta$  et IL-6), de MCP-1, de l'expression d'autres chimiokines (CCL5 ou RANTES joue un rôle dans le recrutement de leucocytes dans les sites inflammatoires), de la fractaline (CX3CL1, chimiokine exprimée au niveaux des CE), des P-sélectines (protéines exprimées à la surface des leucocytes et des plaquettes se liant aux ligands situés sur les CE), et des infiltrats inflammatoires (macrophages et lymphocytes B et T) au sein de lésions plexiformes, ont été mis en évidence dans l'HTAP.

(Balabanian et al., 2002; Van Hung et al., 2014; Montani et al., 2011; Rabinovitch et al., 2014; Soon et al., 2010).

Une augmentation du taux circulant a été corrélée avec une élévation des RVP chez des patients souffrant d'une HPPE dans une étude menée par Kimura (Kimura et al., 2001).

### 3. Les médiateurs du remodelage vasculaire : angiogénèse et apoptose

L'angiogénèse est le développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux déjà existant. Elle se déroule en trois étapes : migration et prolifération des cellules endothéliales, organisation de ces cellules en tubules, maturation des néo-vaisseaux par recrutement des cellules musculaires lisses. Elle est contrôlée par différents activateurs et inhibiteurs de ce processus produits par les cellules saines et tumorales. Les activateurs sont des molécules pro-angiogéniques (FGF, PDGF, VEGF, EGF) et les inhibiteurs de ces molécules anti-angiogéniques (angiostatine, endostatine, thrombospondine).

Le processus d'angiogénèse est observé au sein des séquestres issus d'endartériectomie pulmonaire chez des patients ayant une HPPE (Arbustini et al., 2002). En effet, des néovaisseaux sont principalement présents au niveau des lésions « recanalisés » et thrombotiques. Fait intéressant, les patients souffrant d'HPPE ayant une issue défavorable présenteraient moins de néovaisseaux (Quarck et al., 2015). Dans cette étude, ils ont pu constater que des scores faibles au niveau de l'angiogénèse pourraient prédire une issue défavorable des patients.

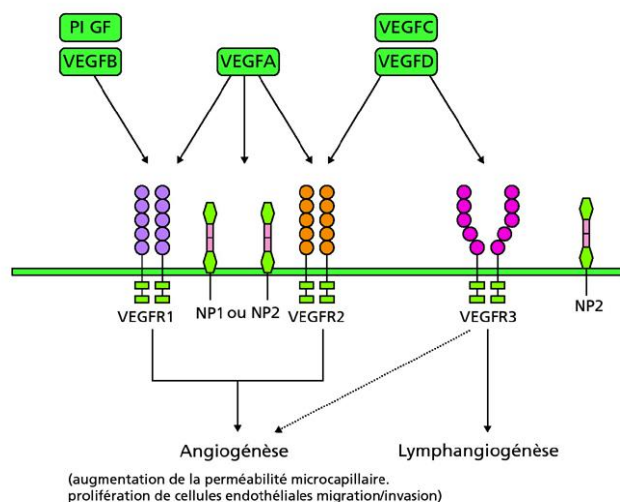
Des données récentes indiquent que des cellules progénitrices angiogéniques putatives type CD34 (+) Flk-1 (+) CD133 (+) sont présentes dans la néo-intima de vaisseaux occlus de patients souffrant d'HPPE (Yao et al., 2009). Des études antérieures sur les animaux ont démontré que la recanalisation de la paroi de la veine peut se produire dans les 24 h après la formation de thrombus (Modarai et al., 2005a, 2005b). Au cours de la phase précoce de la résolution, le thrombus commence à se rétracter de la paroi de la veine, ce qui conduit à la formation de poches bordées de cellules entre le corps du thrombus et l'intima de la paroi de la veine. Au fil du temps, ces canaux fusionnent et s'agrandissent puis le flux sanguin se rétablit à travers et autour d'eux. De nouveaux canaux vasculaires sont également observés dans le corps du thrombus. L'apparition de cette néo-vascularisation est associée à l'expression du VEGF et du FGF-2 (Waltham et al., 2000). Des études réalisées chez l'animal ont montré la résolution d'un thrombus par l'introduction de monocytes chimioattractifs (Ali et al., 2006) ou par injection de facteurs de

croissance angiogéniques tels que le VEGF, le FGF-2 ou l'IL-8 directement dans des thrombus expérimentaux (Waltham et al., 2003).

De nombreux facteurs et voies de signalisation sont impliqués dans les processus d'angiogénèse et de résistance à l'apoptose, avec entre-autre la présence remarquée de facteurs de croissance (FGF, PDGF, VEGF, EGF), mais également de cytokines (IL-1 et IL-6) et de chimiokines (MCP-1/CCL2).

## 1. Le VEGF

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un agent mitogène angiogénique spécifique des CE. Chez les mammifères, la famille du VEGF est composée de quatre glycoprotéines. Cinq isoformes référencées de A à E ont été identifiées ainsi que le PGF (Placental growth factor 1 et 2). Ils sont principalement synthétisés par la cellule tumorale elle-même ou par les cellules du micro-environnement. Le VEGF agit sur des récepteurs à activité tyrosine kinase de haute affinité : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Ces récepteurs sont principalement situés sur la membrane des CE. La fixation de VEGF-A sur son récepteur membranaire entraîne au niveau de la CE, l'activation d'une cascade de phosphorylation menant à des signaux de prolifération, de migration, d'inhibition d'apoptose et l'élévation de la perméabilité des cellules immunitaires et de précurseurs endothéliaux (Figure 8).



**Figure 8 : La famille des VEGF, les récepteurs membranaires (VEGFR) et les corécepteurs (NP1, NP2) (Valentin et al., 2011)**

La sécrétion du VEGF n'est pas une caractéristique des CE normale. Il semble que le rôle possible du VEGF dépende de la nature normale ou pathologique des CE.

Dans le contexte d'HTAP, bien que l'isoforme VEGF-A ait été largement étudiée et qu'on lui ait prêté un rôle protecteur, une étude a attribué au VEGF-B un rôle pathogène qui accentuerait le remodelage vasculaire (Wanstall et al., 2002).

De nombreuses études sur l'HTAP ont mises en évidence les effets bénéfiques du VEGF. En effet, la surexpression du VEGF par une approche de thérapie génique ou de thérapie cellulaire (Partovian et al., 2000) s'est révélée efficace pour prévenir le développement et la progression de l'HTAP. A l'inverse, le blocage pharmacologique du VEGF favorise l'HTAP sévère (Le Cras et al., 2002).

Contrairement aux autres formes d'HTAP, les taux sériques du VEGF sont plus faibles chez des patients souffrant d'HPPE et également chez des patients ayant une hypertension pulmonaire persistante post-endarterectomie pulmonaire. Ils ont également pu montrer que le taux sérique du VEGF est inversement corrélé à la PAPm mesurée 3 jours après chirurgie.

Ces résultats suggèrent que l'angiogenèse artérielle pulmonaire accrue pourrait être responsable de la perméabilité partielle de la matière obstructive avec un maintien du lit vasculaire post-obstructif préservé grâce à des facteurs vasoactifs circulants.

## 2. FGF : Fibroblast growth factor

Les FGF forment une famille comportant 23 membres identifiés à ce jour chez l'Homme, nommés de FGF1 à FGF23. Ce sont des polypeptides d'environ 150 acides aminés, synthétisés par les fibroblastes, les CE ou encore les CML. Ils se fixent sur 4 types de récepteurs à activité kinase : FGFR-1, -2, -3, -4. Par l'intermédiaire d'héparane sulfate protéoglycanes (protéines associées à la matrice extracellulaire et modifiées par l'addition d'héparane sulfate), les FGF se lient au récepteur, induisant une autophosphorylation et l'activation de la cascade de signalisation (Armulik et al., 2005) (Figure 9).



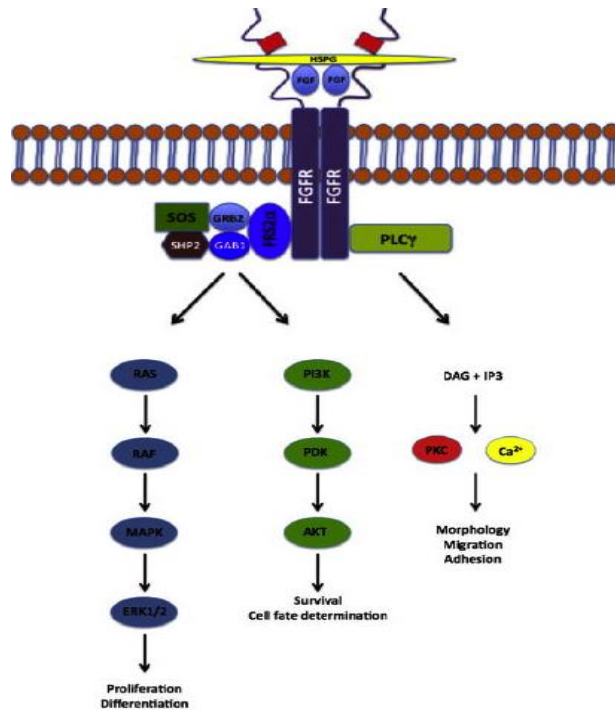


Figure 9 : La voie de signalisation des FGF/FGFR (Teven et al., 2014)

Le FGF-2 est principalement exprimé par les cellules tumorales, les fibroblastes, les CE et les macrophages (Arcot et al., 1995; Pötgens et al., 1995; Smith et al., 1999). Après sa sécrétion, il est séquestré et stocké dans la matrice extracellulaire. Lors du processus protéolytique, le FGF-2 est libéré et active les cellules cibles en stimulant la prolifération cellulaire (Benezra et al., 1993; Buczek-Thomas et al., 2004; Thompson et Rabinovitch, 1996). Le FGF-2 devient alors capable de se fixer à son récepteur (FGFR-1) exprimé sur la surface des cellules vasculaires (Inoue et al., 2002). La transduction du signal suit en grande partie l'une des trois voies. La voie de la kinase RAS/MAP contrôle la prolifération et la différenciation cellulaire. La voie PI3/AKT régule la survie cellulaire. Enfin, lors de la liaison de PLC $\gamma$  au FGFR activé, les protéines DAG et IP3 sont formées, favorisant l'activation de la PKC. Cette voie intervient dans la morphologie des cellules, la migration et l'adhérence (Figure 9). Durant le développement, le FGF-2 produit par la CE, module la migration et la prolifération des CML et semble également être impliqué dans le remodelage pathologique. Le FGF-2 est un des facteurs de croissance suscitant le plus d'intérêt au sein de l'HTP. En effet, dans l'HTAP humaine et expérimentale, les taux de FGF-2 circulant et pulmonaire sont anormalement élevés (Arcot et al., 1995; Benisty et al., 2004). Dans l'HTAP humaine, le FGF-2 est surproduit par les CE-AP et agit de façon autocrine, en stimulant leur prolifération et leur résistance à l'apoptose (Izikki et al., 2009; Tu et al., 2011). Cette

surproduction jouerait un rôle prépondérant dans l'hyperplasie du muscle lisse et dans l'acquisition du phénotype anormale des CE (Tu et al., 2011).

### 3. PDGF : Platelet-derived growth factor

Le PDGF est une protéine sécrétée essentiellement par les plaquettes. La protéine est formée de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par des ponts disulfures formant soit des homodimères (PDGF-A, -B, -C, -D) soit des hétérodimères (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC, -DD). Cet assemblage intracellulaire se réalise avant leur libération. Afin d'être active, les formes PDGF-CC et PDGF-DD perdent leur domaine CUB (pour complément C1r /C1s, UEGF, BMP1) ; à la différence des formes PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, qui le sont déjà. Le PDGF est sécrété par de nombreux types cellulaires y compris les CE, les CML et les macrophages. Sa sécrétion est activée par le TNF- $\alpha$ , la thrombine, le facteur Xa, l'IL-1 et l'angiotensine.

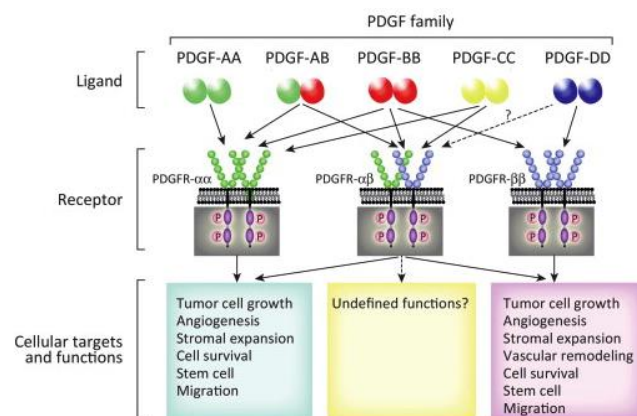


Figure 10 : Les facteurs de croissance PDGF et leurs récepteurs (Cao, 2013)

Le PDGF est capable d'induire la prolifération et la migration des CML et des fibroblastes via sa fixation aux récepteurs à activité tyrosine kinase (PDGFR- $\alpha$  et PDGFR- $\beta$ ) qui forment des homo ou des hétéro-dimères PDGFR- $\alpha\alpha$ , PDGFR- $\alpha\beta$ , PDGFR- $\beta\beta$ .

Il existe des différences d'affinité ligand/récepteur. En effet, le PDGFR-AA ne se fixe que sur PDGFR- $\alpha\alpha$ . Le PDGF-BB est le seul à se lier de manière équivalente à toutes les formes de récepteurs avec une haute affinité. Le PDGF-AB et le PDGF-CC se fixent aux récepteurs PDGFR- $\alpha\alpha$  et PDGFR- $\alpha\beta$  enfin, le PDGF-DD active avec une haute affinité PDGFR- $\beta\beta$  et avec une faible affinité PDGFR- $\alpha\beta$  (Figure 10).

En activant les récepteurs PDGFR, s'en suit une cascade d'activation de protéines cytoplasmiques, notamment la synthèse d'un inhibiteur de métalloprotéinases qui augmente la prolifération cellulaire. Un rétrocontrôle est assuré une fois l'activation des récepteurs. En effet, les récepteurs sont internalisés et l'activité kinase est inhibée (Yihai, 2003).

Le PDGF joue un rôle clé dans la progression de plusieurs maladies fibro-prolifératives comme l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire et l'HTAP (Humbert et al., 1998). Son rôle a été également démontré dans des modèles expérimentaux d'HTAP avec une augmentation de l'expression du récepteur PDGFR et avec une normalisation de l'HTAP par blocage du PDGFR (Schermyly et al., 2005).

De plus, une augmentation de l'expression du PDGF (A et B) et de ses récepteurs (PDGFR- $\alpha$  et PDGFR- $\beta$ ) a été observée dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP sévère (Perros et al., 2008).

Dans deux modèles animaux d'HTAP, l'administration d'un antagoniste du récepteur du PDGF, l'imatinib (STI571) a permis la régression du remodelage pulmonaire (Schermyly et al., 2005). Il a été montré que l'imatinib possède un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique sur les CML des artères pulmonaires dérivées des patients atteints d'HTAP stimulées par le PDGF (Nakamura et al., 2012). Ces données montrent que l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinases dans l'HTAP a un grand potentiel.

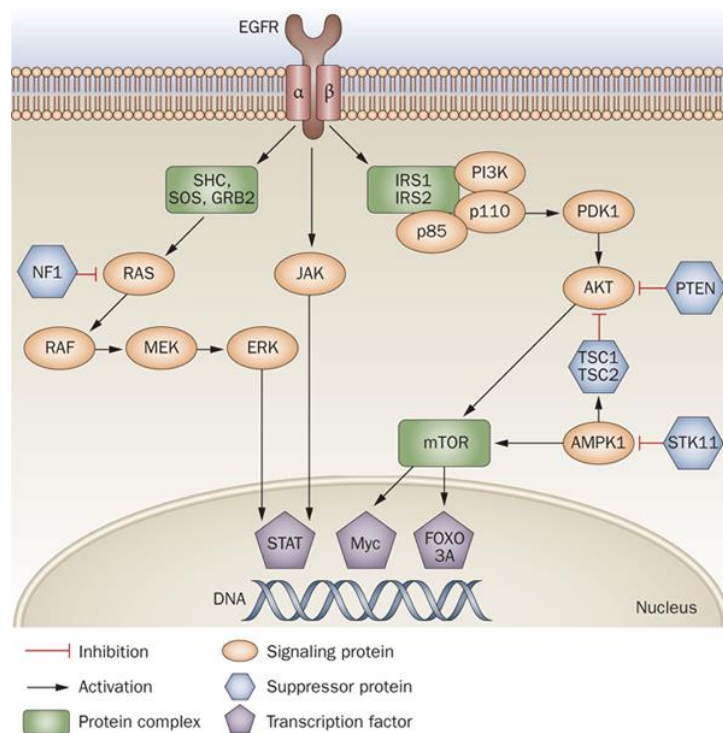
#### 4. EGF : Epidermal growth factor

L'EGF appartient à une famille d'une douzaine de facteurs de croissance. L'action de ces facteurs de croissance est médiée par une famille de quatre récepteurs membranaires ubiquitaires appelés ErbB et nommés ErbB1 (ou ERFR ou encore HER1), ErbB2, ErbB3, ErbB4. Ce sont des récepteurs transmembranaires exprimés par de nombreuses cellules saines, dans lesquelles ils participent notamment dans la différenciation cellulaire. Ces récepteurs se composent d'un domaine extracellulaire, auquel peuvent se fixer différents ligands (comme l'EGF, le TGF $\alpha$ , l'amphireguline et l'epireguline), d'un domaine transmembranaire d'ancrage et d'un domaine intracellulaire qui possède une activité tyrosine-kinase.

L'activation d'ErbB1 débute par la fixation du ligand entraînant la dimérisation du récepteur puis s'en suit une cascade de phosphorylations. Ces voies de signalisation aboutissent, *in fine*, à la

libération de facteurs de transcription qui régulent l'expression de nombreux gènes-cibles impliqués notamment dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Plusieurs voies peuvent être activées par les récepteurs de la famille HER : la voie des MAP-kinases faisant intervenir successivement RAS, RAF, MEK, ERK. Elle aboutit à la libération de facteurs transcriptionnels tels que Jun, Fos, Myc ; la voie Pi3K/AKT impliquée dans la résistance à l'apoptose et la prolifération cellulaire. AKT possède plusieurs cibles qui peuvent être activées notamment par mTOR ou inhibées par la voie protéine kinase C/JAK /STAT (Figure 11).



**Figure 11 : Voies d'activation de l'EGFR et niveaux d'action possibles (Harris et McCormick, 2010).**

L'EGF semble être impliqué dans l'HTAP. La prolifération et la migration des CML induites par l'EGF sont dépendantes de l'un des composants de la matrice extracellulaire la ténascine-C (TN-C). L'EGF est co-localisé avec la TN-C dans des lésions vasculaires chez les patients atteints d'HTAP confirmant son rôle direct dans la progression de la maladie (Jones et al., 1997).

Des études menées avec des modèles animaux renforcent l'implication de l'EGF au sein de l'HTAP. Chez le rat, le blocage de la voie de l'EGFR par l'action d'un inhibiteur de ce dernier (PK1166), permet la régression de l'HTAP induite par la monocrotaline (Dahal et al., 2010;

Merklinger et al., 2005). Les effets bénéfiques des antagonistes du récepteur de l'EGF sont médiés par leur effet anti-prolifératif sur les CML pulmonaires (Dahal et al., 2010).

### 5. S100A4/Mts1 (S100 calcium binding protein A4)

La S100A4/Mts1 est une protéine conférant un phénotype métastatique aux cellules tumorales. Cette protéine pourrait être liée à la résistance à l'apoptose et à l'angiogenèse. En effet, environ 5% des souris transgéniques surexprimant S100A4/Mts1 développent des changements artériels pulmonaires : à savoir une hyperplasie de l'intima menant à l'occlusion du lumen artériel.

Son implication dans l'élévation des pressions pulmonaires a été écartée, puisqu'elle est faiblement détectée au niveau pulmonaire en l'absence d'hypertension ou dans les stades précoces de la maladie. Cependant, S100A4/Mts1 peut avoir une fonction importante dans le développement de lésions artérielles sévères observées dans les stades avancés de la maladie.

Au niveau moléculaire, S100A4/Mts1 interagit avec le suppresseur de tumeur p53, modulant sa phosphorylation, sa capacité de liaison à l'ADN et son activité transcriptionnelle. Cette interaction confirme l'implication de S100A4/Mts1 dans les processus d'inhibition de l'apoptose.

Il a été démontré in vitro, que S100A4/Mts1 interagit avec le facteur pro-apoptotique Bax, suggérant une augmentation des cellules résistantes à l'apoptose (Greenway et al., 2004).

Enfin, S100A4/Mts1 semble être impliquée dans l'angiogénèse et dans la progression tumorale (Helfman et al., 2005).

### 6. L'Angiopoïétine

L'Angiopoïétine est une famille de facteurs angiogéniques essentielle dans le développement des vaisseaux pulmonaires. Elle joue un rôle clé dans la vasculogénèse embryonnaire et post-natale.

Il y a maintenant quatre angiopoïétines identifiées comme ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL4... En outre, il existe un certain nombre de protéines qui sont étroitement liées aux angiopoïétines.

Cette protéine est produite par les cellules du mésenchyme pendant la vie embryonnaire et par les péricytes précurseurs des CML. Elle est multifonctionnelle. En effet, c'est un inducteur d'angiogenèse, de survie cellulaire endothéliale, de maturation vasculaire et intervient dans la migration cellulaire.

Elle induit la formation de tubes endothéliaux en favorisant la migration et la division de ces cellules. Elle intervient également dans la stabilisation vasculaire par recrutement des cellules musculaires lisses.

L'ANGPT1 agit sur un récepteur de type tyrosine kinase à haute affinité : le récepteur TIE-2, présent uniquement sur l'endothélium vasculaire. L'activation de TIE-2 conduit à la phosphorylation du récepteur et au recrutement de nombreuses protéines adaptatrices. Cela aboutit à l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire qui maintiennent le phénotype quiescent des CE ou transmettent le signal au cours de l'activation des CE (Papapetropoulos et al., 1999).

Une étude a mise en évidence la relation entre l'activation de l'ANGPT1, le récepteur TIE-2 phosphorylé et la sévérité de l'HTAP (Du et al., 2003). Quant aux mécanismes, il a été proposé que la stimulation des CE-AP par l'ANGPT1 induit la sécrétion de 5-HT, qui agit de manière paracrine sur les CML-APs en favorisant l'hyperplasie de ces cellules (Dewachter et al., 2006; Sullivan et al., 2003). A l'inverse, l'ANGPT2 induit la mort cellulaire et perturbe la vascularisation. Pourtant, lorsqu'elle est associée à des facteurs de croissance vasculaires endothéliaux comme le VEGF, elle peut favoriser la néo-vascularisation (Fagiani et Christofori, 2013). En effet, l'expression de l'ANGPT2 en l'absence de VEGF conduit à la mort cellulaire endothéliale et à la régression vasculaire (Harmey et Bouchier-Hayes, 2002). Des niveaux accrus d'Ang-2 favorisent l'angiogenèse tumorale, la métastase et l'inflammation. L'ANGPT2 fonctionne comme un antagoniste de l'ANGPT1 et favorise la régression des vaisseaux. L'ANGPT1 et l'ANGPT2 sont des modulateurs de la perméabilité de l'endothélium et de la fonction de barrière.

#### 4. Les médiateurs du processus d'adhésion cellulaire

Les molécules d'adhérence cellulaire CAM (Cell Adhesion Molecules) sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle important au cours du développement embryonnaire. Chez l'adulte normal, ces protéines assurent la maintenance des épithéliums et la réparation tissulaire et sont impliquées dans certains processus pathologiques tels que l'inflammation ou le cancer. De surcroît, les CAM, assurent la reconnaissance spécifique intercellulaire ou entre cellules et la MEC. Elles ont également la capacité d'assurer la formation de contacts stables intercellulaires ou entre une cellule et la MEC. Enfin, elles attestent la transmission de signaux capables de modifier le comportement de la cellule et son environnement.

Les partenaires moléculaires d'interactions ainsi que les types cellulaires en jeu peuvent être identiques ou différents. Les CAM se rassemblent en 4 superfamilles multigéniques codant pour des glycoprotéines transmembranaires, regroupées selon leurs caractéristiques structurales : les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les immunoglobulines (Figure 12) (Lodish et al., 2000).

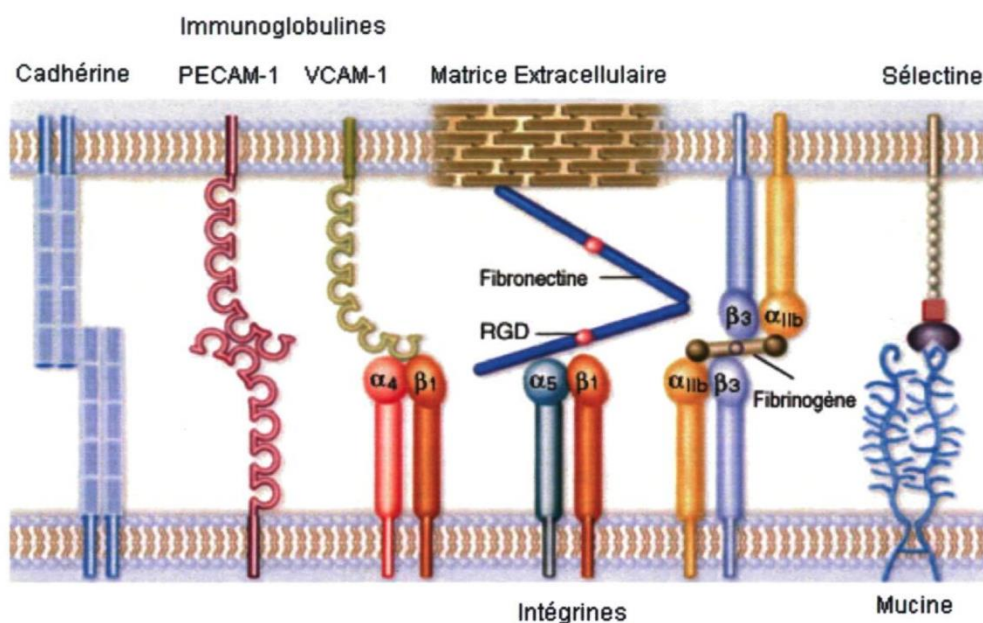


Figure 12 : Les molécules d'adhésions réparties en 4 familles : les intégrines, les cadhérines, les sélectines et les immunoglobulines (Frenette et Wagner, 1996)

## 1. Les intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères glycosylés transmembranaires composés de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Takada et al., 2007). Elles constituent une superfamille de récepteurs de nombreuses molécules de la MEC, en particulier au niveau de la membrane basale, et sont exprimées par de nombreux types cellulaires comme les cellules neuronales, les leucocytes, les cellules tumorales, les cellules cardiaques, les cellules du muscle squelettique et les cellules vasculaires.

Les intégrines comportent trois domaines : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. Elles possèdent 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  différentes et il en existe d'autres types. À ce jour, on dénombre 24 couples (dimères)  $\alpha\beta$  fonctionnels. Chaque combinaison présente des affinités spécifiques pour différents ligands. Les sous-familles se divisent sur la base des chaînes  $\beta$ . La sous-famille des  $\beta_2$ -intégrines (CD18) s'exprime uniquement à la surface des leucocytes. Quatre types de chaînes  $\alpha$  peuvent s'associer avec le CD18 : le CD11a ( $\alpha_L$ ), le CD11b ( $\alpha_M$ ), le CD11c ( $\alpha_X$ ) et le CD11d ( $\alpha_D$ ). La sous-unité  $\alpha$  détermine la spécificité du ligand de l'intégrine, et la sous-unité  $\beta$  est reliée au cytosquelette et aux molécules intracellulaires en affectant de multiples voies de signalisation. Leurs principaux ligands extracellulaires sont le collagène de type I et IV, la laminine, la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène.

Les intégrines sont liées au cytosquelette et constituent par conséquent, une des voies majeures de la transduction des signaux venus de la MEC à destination des cellules épithéliales (régulation de l'expression de leurs gènes). Les intégrines jouent un rôle essentiel dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires : forme, polarité, prolifération, migration, survie, différenciation. (Wu et Reddy, 2012).

Les intégrines sont activées par une voie de signalisation de l'intérieur vers l'extérieur ou « Inside-out ». Différents stimuli activent les voies de signalisation qui agissent sur la portion intracellulaire des intégrines. Ces voies de signalisation modifient l'affinité du domaine extracellulaire pour le ligand (Arnaout et al., 2007). De plus, la liaison des intégrines à leurs ligands induit une signalisation intracellulaire (ou « Inside-in ») qui mène à l'activation de diverses voies de signalisation cytoplasmique (Legate et Fässler, 2009; Legate et al., 2009).



Une des principales fonctions des intégrines est d'établir le contact entre les cellules et la MEC. Ce contact permet la réorganisation du cytosquelette par la formation de fibres de tension, entraînant la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire. De surcroît, l'interaction des intégrines avec la MEC est essentielle à la survie et à la prolifération cellulaire (Jones et Walker, 1999).

Certaines intégrines peuvent se lier à d'autres molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 et VCAM-1. Ces interactions conduisent à l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium et l'extravasation (Johnson-Léger et al., 2000). Suivant la stimulation par différentes chimiokines telles que IL-8 ou encore MCP-1, les récepteurs couplés aux petites protéines G sont activés par phosphorylation des intégrines  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 1$ . Ceci permettra une interaction avec ICAM-1 et VCAM-1 exprimés à la surface des CE (Gouwy et al., 2004).

## 2. Les cadhérines

Les cadhérines, principales protéines de l'adhérence intercellulaire sont des glycoprotéines transmembranaires calcium-dépendants regroupées par leur homologie au niveau de leur « domaine cadhérine » se trouvant sur la partie extracellulaire de la protéine. Ce domaine est constitué d'une répétition en tandem d'une séquence d'acides aminés chargés pouvant lier les ions  $Ca^{2+}$ . Elles jouent un rôle important dans les processus du développement ainsi que dans les processus pathologiques. Les cadhérines sont indispensables à la formation des complexes de jonction. La famille des cadhérines comporte une trentaine de membres identifiés, dont l'expression est spécifique du tissu. Elles sont nommées par une lettre qui rappelle le tissu où elles sont exprimées de manière préférentielle (Stepniak et al., 2009). Elles sont concentrées dans les jonctions adhérentes et sont associées au cytosquelette par les caténines. Cette association permet une modulation du cytosquelette nécessaire en partie lors d'un contact ferme entre les cellules ainsi qu'à l'organisation de feuillets de cellules (Kobielak et Fuchs, 2004). Le système cadhérine-caténine joue un rôle central dans l'organisation structurale et fonctionnelle des contacts cellule-cellule dans les épithéliums (Shapiro and Weis, 2009). On distingue d'une part, les cadhérines classiques : la E-cadhérine (épithéliale) ou uvomoruline, impliquée dans la compaction de la morula et dans la génèse et la maintenance des couches de cellules épithéliales ainsi que la N-cadhérine (nerveuse) et la P-cadhérine (placentaire) (Takeichi et al.,

1988, 1989). D'autre part, il existe des cadhérines non classiques dont les desmocollines et la desmogléine.

Dans les tissus, les cellules inhibent leur propre croissance en interagissant les unes avec les autres grâce à la présence des cadhérines : on parle alors d'inhibition de contact.

Les cadhérines ont la capacité d'influencer certaines voies de signalisation intracellulaires. En effet, la portion extracellulaire de la E-cadhérine peut se lier au RTKs (Récepteurs tyrosine kinase) et nuire à la reconnaissance de leurs ligands (Andl et Rustgi, 2005).

### 3. Les sélectines

Les sélectines sont une famille de glycoprotéines intégrales qui permettent des interactions transitoires par des liaisons hétérophiles avec des glycoprotéines de surface exprimées par d'autres cellules.

Il existe trois types de sélectines : les sélectines E (endothéliale), les sélectines P (plaquettaire) et les sélectines L (leucocytaire) (McEver, 2002). Chaque sélectine possède de nombreux domaines. Leur domaine extracellulaire comprend un domaine de type EGF, un domaine structural et un domaine externe de type lectine. Elles se lient de façon calcium-dépendante, à des motifs particuliers de sucres portés par des chaînes oligosaccharides présentes à la surface des cellules adjacentes. La L-sélectine est exprimée de manière constitutive par les leucocytes à l'inverse de la E-sélectine, qui n'est exprimée par les cellules endothéliales, qu'à la suite de stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Vestweber et Blanks, 1999). Les sélectines permettent des interactions entre les leucocytes et la paroi vasculaire. La P-sélectine est entreposée dans les corps de Weibel-Palade des CE non activées et dans les granules  $\alpha$  des plaquettes sanguines. Suivant la stimulation par les histamines, les thrombines ou les esters de phorbols, les P-sélectines sont rapidement relocalisées à la surface des cellules. Les sélectines sont principalement responsable du roulement leucocytaire. Elles permettent le contact entre les leucocytes et la paroi endothéliale par l'interaction avec leurs ligands tel que PSGL-1 (P-Selectin glycosylates ligand1). L'augmentation de son taux est un marqueur de dysfonction endothéliale et/ou de l'activation plaquettaire et peut indiquer la présence d'un état d'hypercoagulabilité (Ruf et Patscheke, 1995a, 1995b).

Des taux élevés de P-sélectine et des taux diminués de thrombomoduline sont retrouvés aussi bien dans l'HTAPi que dans l'HTAP "secondaire". Par ailleurs, la surexpression cytokine-dépendante des P-sélectines par les CE favorisent la formation de thrombose *in situ* chez les patients souffrant d'HTAP (Chaouat et al., 1996).

#### 4. Les immunoglobulines

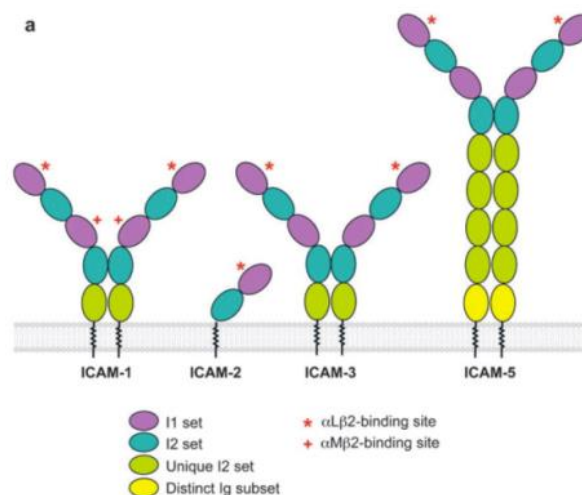
Les immunoglobulines sont des glycoprotéines dotées d'une fonction anticorps. Elles regroupent plusieurs sous-familles de récepteurs transmembranaires présentant un nombre variable de domaines extracellulaires homologues aux immunoglobulines (Wright et al., 2004). Elles sont impliquées dans les interactions entre les cellules immunitaires et leurs partenaires cellulaires (comme les CE ou les cellules présentatrices d'antigènes). Les principales immunoglobulines d'adhérence cellulaire sont la N-CAM (Neural-CAM), la I-CAM (Intercellular-CAM) et la V-CAM (Vascular-CAM). Qu'il s'agisse de molécules d'adhésion ou des anticorps, toutes les molécules de la superfamille des immunoglobulines sont définies par la structure particulière de leur domaine extra-cellulaire (boucles reliées par des ponts disulfures). Les immunoglobulines sont formées de deux chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ) et de deux chaînes légères ( $\lambda$  ou  $\kappa$ ). Les chaînes lourdes (masse moléculaire  $\approx$  50kDa ; 450 aa) varient selon leurs classes ( $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ) ou leurs sous-classes reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures (S-S). Les chaînes légères (masse moléculaire  $\approx$  25kDa ; 212 aa) sont reliées aux chaînes lourdes par des ponts disulfures.

Les immunoglobulines sont calcium-indépendante, contrairement aux autres molécules d'adhésion qui sont exprimés de manière constitutive au niveau de la membrane plasmique. Elles réalisent des liaisons homophiles mais qui peuvent se faire avec des membres différents, ainsi que des liaisons hétérophiles avec des protéoglycanes de la matrice extracellulaire et des intégrines (Frey et al., 2013).

##### 4.1 ICAM

La famille des molécules d'adhésion moléculaire intercellulaire comporte 5 membres : ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), ICAM-4 (LW) et ICAM-5 (TLN). Chacune d'entre elles présente un nombre de domaines extracellulaires homologues aux immunoglobulines

(Gahmberg, 1997). Elles ont la capacité de lier différentes intégrines et voient leur expression variée selon le type cellulaire. En effet, bien que tous les membres puissent se lier à LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ), il y a uniquement ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-4 qui puissent se lier à MAC-1 ( $\alpha M\beta 2$ ) (Figure 13) (Bailly et al., 1995; Diamond et al., 1990; Xie et al., 1995). Les ICAM (-1, -2 et -3) sont exprimés à la surface des leucocytes. Les ICAM (-1 ; -2) sont également exprimés à la surface des CE (Gahmberg, 1997). Les ICAM-4 sont exprimés à la surface des érythrocytes. Enfin, les ICAM-5 sont exprimés à la surface des neurones du télencéphale. Chaque membre de cette famille possède par conséquent des caractéristiques spécifiques. Cependant, il est possible que certains membres remplissent des fonctions similaires : en effet c'est le cas pour ICAM-1 et ICAM-2, qui sont impliqués dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (de Fougerolles et al., 1991).



**Figure 13 : Structure d'ICAM et les sites de liaison de l'intégrine de liaison (Luo et al., 2007)**

#### 4.1.1 ICAM-1 (CD54)

ICAM-1 (CD54) est une protéine transmembranaire hautement glycosylée variant de 80 à 114 kDa (selon le degré de glycosylation). C'est un membre de la superfamille des immunoglobulines et possède plusieurs domaines : cinq domaines amino-terminaux extracellulaires fortement hydrophobes, stabilisés par des ponts disulfures entre des résidus cystéines fortement conservés, un domaine transmembranaire hydrophobe unique et un domaine cytoplasmique carboxy-terminal. Sa structure se caractérise par une glycosylation lourde à

différents degrés suivant le type cellulaire. De plus, ICAM-1 existe sous une forme soluble appelée sICAM-1. Cette forme se compose de 453 résidus formant la portion extracellulaire d'ICAM-1 et à la particularité de se retrouver non seulement en monomères mais également en multimères (Witkowska et Borawska, 2004). Son poids moléculaire d'environ 90 kDa peut varier selon le degré de glycosylation.

Un taux élevé de sICAM-1 peut être utilisé comme marqueur de risque des accidents cardiovasculaires (Rohde et al., 1999; Tanne et al., 2002). Les taux élevés de sICAM-1 dans le sérum de patients atteints de cancer gastrique, colorectal, rénal et pulmonaire semblent être un indicateur de mauvais pronostic (Dowlati et al., 2008; Kang et al., 2005; Nakata et al., 2000).

L'interaction avec son récepteur LFA-1 se fait par son domaine I, situé en N-terminal grâce aux acides aminés E34, K39, M64, Y66, N68 et Q73. ICAM-1 interagit également avec l'intégrine Mac-1 (CD11b/CD18), le fibrinogène, les rhinovirus et les érythrocytes infectés par le parasite *Plasmodium falciparum*, avec des régions différentes de celles liant LFA-1 (Staunton et al., 1990). ICAM-1 est un type de molécule d'adhésion intercellulaire présent en faibles concentrations dans les membranes des leucocytes et les CE. Lors de la stimulation de cytokines, les concentrations d'ICAM-1 augmentent considérablement. L'expression d'ICAM-1 peut être stimulée par l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) et est exprimé par l'endothélium vasculaire, les macrophages et les lymphocytes.

#### 4.1.2 Le gène d'ICAM-1

Le gène humain codant pour ICAM-1 se trouve sur le chromosome 19 et se compose de 7 exons séparés par 6 introns (Figure 14A). Au niveau de la région codante du gène (identifiée par la zone ombragée (Figure 14B), on distingue 5 domaines extracellulaires (D1 à D5) homologues aux immunoglobulines d'ICAM-1, et codés par son propre exon. Il existe deux sites d'initiation de la transcription situés à 319 et 123 paires de bases en amont du codon d'initiation AUG. En région N-terminale se trouve le peptide signal (SP). En revanche en C-terminal se trouvent la région transmembranaire (TM) et la portion cytoplasmique (Cyt) (Voraberger et al., 1991).

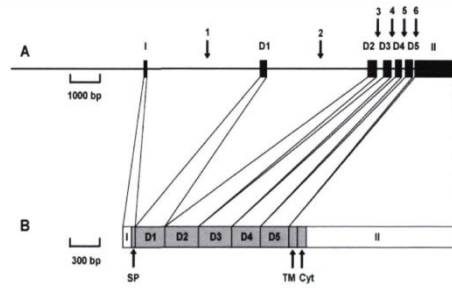


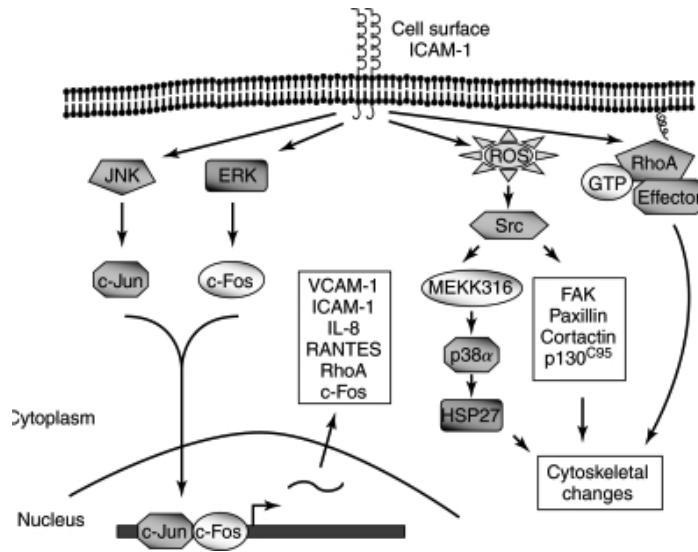
Figure 14 : Structure du gène ICAM-1 (Voraberger et al., 1991)

#### 4.1.3 Activation de la transcription du gène codant ICAM-1

Le niveau d'expression d'ICAM-1 présent à la surface des leucocytes de même que les CE, varie selon l'état d'activation des cellules (Gahmberg, 1997). En effet, divers signaux et facteurs de transcription régulent sa synthèse. Parmi ces derniers, on retrouve l'acide rétinoïque, les lipoprotéines à faible densité (LDL), les esters de phorbol, les radicaux libres de l'oxygène ( $H_2O_2$ ), le NF- $\kappa$ B, les JAK/STAT, l'IFN $\gamma$ , l'AP-1, les MAPK et les PKC (Oh et al., 2007; Riedel et al., 2003; Roebuck, 1999; Roebuck et Finnegan, 1999; Shrikant et al., 1994; Zarbock et al., 2007). Selon la reconnaissance de ces diverses molécules, de multiples voies de signalisation sont activées, menant à la transcription de nombreux facteurs. Ces facteurs de transcription se lient à des séquences spécifiques présentes dans le promoteur d'ICAM-1 et par conséquent activent la transcription du gène.

#### 4.1.4 Inactivation d'ICAM-1

L'adhésion induite par ICAM-1 est régulée par son clivage à la surface des CE. Ce processus est conduit par des protéases et a pour conséquence la présence d'ICAM-1 soluble (sICAM-1) dans la circulation sanguine. En effet, les leucocytes peuvent sécréter une protéase, l'élastase (HLE), capable de sectionner la portion extracellulaire d'ICAM-1, exprimées à la surface des cellules (Champagne et al., 1998). Lorsqu'elle est sectionnée, ICAM-1 est libérée sous forme soluble, entraînant la diminution de la protéine à la surface des cellules. Ce phénomène régule à la baisse la réponse immunitaire et diminue la migration des leucocytes vers les tissus périphériques. La liaison d'ICAM-1 induit une variété de réponses dans les CE, comprenant l'activation de Src, RhoA, JNK et ERK ainsi que la production de radicaux libres de l'oxygène (Figure 15).



**Figure 15 : Les voies de signalisation activées par ICAM-1 (Rahman et Fazal, 2009)**

L'activation des effecteurs en aval notamment RhoA et ROS / Src conduit à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cependant, l'activation de JNK et ERK induit la transcription de AP-1 (Jun / Fos), conduisant à l'activation de l'expression de certains gènes tels qu'ICAM-1 et VCAM-1 (Figure 15). Néanmoins, il existe certaines isoformes d'ICAM-1 qui proviennent de différents épissages du gène. Ces isoformes présentent des spécificités différentes au niveau de leurs ligands, ainsi qu'une résistance également différente face aux protéases telle que l'élastase (Robledo et al., 2003). Ces isoformes participeraient à la régulation de la fonction d'ICAM-1. De plus, diverses cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 régulent négativement l'expression d'ICAM-1 (Opal et DePalo, 2000).

#### 4.1.5 Fonctions d'ICAM-1

Par son interaction avec les  $\beta 2$ -intégrines, ICAM-1 est connue essentiellement pour son rôle dans l'extravasation des leucocytes. De plus, ICAM-1 intervient dans les réactions immunitaires et contribue au remodelage du cytosquelette.

#### 4.1.6 Liaisons aux $\beta 2$ -intégrines et aux autres récepteurs

Les deux principaux ligands d'ICAM-1 sont les intégrines LFA-1 (CD11a/CD18) et MAC-1 qui sont exprimées à la surface des lymphocytes T et des macrophages respectivement (Mazzone et Ricevuti, 1995).

LFA-1 participe à l'adhésion intercellulaire et la signalisation intracellulaire. Il est impliqué dans un large panel de processus immunologiques comme l'extravasation des leucocytes, la présentation de l'antigène et la prolifération des lymphocytes T (Marlin et Springer, 1987). L'activation du récepteur LFA-1 par ICAM-1 conduit à l'activation du récepteur, qui permet aux leucocytes d'adhérer aux CE et par la suite de transmigrer dans les tissus (Yang et al., 2005). Par ailleurs, le récepteur LFA-1 a également été trouvé sous une forme soluble semblant lier et bloquer le ligand ICAM-1 (Gjelstrup et al., 2010; Kragstrup et al., 2014). ICAM-1 possède également d'autres ligands tels que le fibrinogène, CD43 et MUC-1. D'ailleurs, il a été démontré que sa liaison avec le fibrinogène amplifiait l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et favorisent leur transmigration (Duperray et al., 1997). Par ailleurs, le fibrinogène abondamment exprimé à la surface des leucocytes et des plaquettes sanguines, semble être impliqué dans la transmigration des leucocytes. Rosenstein et ses collaborateurs ont démontré que le blocage du site de reconnaissance du fibrinogène, par des anticorps IG12 et 2D5, empêche la fixation d'ICAM-1 et conduit à une forte diminution de l'adhésion et de la transmigration des leucocytes *in vitro*. Par ailleurs, ICAM-1 est l'unique ligand de la glycoprotéine transmembranaire MUC-1 (Mucin-1). Les mucines bordent la surface apicale des CE des poumons, de l'estomac, des intestins, des yeux et d'autres organes. Elles protègent le corps contre l'infection, en se liant à des oligosaccharides présents dans le domaine extracellulaire des agents pathogènes et empêchent ces derniers d'atteindre la surface cellulaire (Regimbald et al., 1996). Les MUC-1 remplissent leur rôle de « protecteur » en réalisant une fonction première de lubrification. Elles sont surexprimées à la surface de certaines cellules cancéreuses (Bitler et al., 2009; Brayman et al., 2004). Une étude a démontré le rôle prépondérant qu'apporte l'interaction MUC-1/ICAM-1 dans la transmigration de l'endothélium par certaines cellules exprimant MUC-1 (Rahn et al., 2005).

#### 4.1.7 Rôle dans les réactions immunitaires

Connue pour son importance dans la stabilisation des interactions entre les cellules et à faciliter la transmigration des leucocytes à travers la couche endothéliale, ICAM-1 est également caractérisée comme étant un site pour l'entrée cellulaire de rhinovirus humain (Abraham et



Colonna, 1984). En raison de son intervention dans les réponses immunitaires, il est possible qu'ICAM-1 opère dans la transduction du signal. De surcroît, ICAM-1 produit des effets pro-inflammatoires tels que le recrutement de leucocytes inflammatoires à travers des cascades impliquant un certain nombre de kinases.

Le niveau d'expression d'ICAM-1, présent sur tous les leucocytes et les CE, varie selon l'état d'activation des cellules (Gahmberg, 1997; Hogg et al., 2002). Par ailleurs, les dommages dans la structure de la molécule ICAM-1 ou encore des anomalies de son expression entraînent certains désordres immunologiques (Slight et al., 1993), des mélanomes, des tumeurs lymphoïdes et myéloïdes, des désordres neurologiques, un rejet d'organes transplantés, une ischémie, l'artérosclérose et l'asthme allergique (Grzelewska-Rzymowska and Pietrzkowicz, 2004; Witkowska and Borawska, 2004).

#### 4.1.8 Rôle dans le remodelage du cytosquelette

Le cytosquelette est constitué de microfilaments d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules. L'organisation de ces filaments en structures complexes joue un rôle primordial au niveau de la morphologie cellulaire ainsi qu'au niveau de la motilité, de la division cellulaire, des interactions intercellulaires ou avec la MEC. Suivant une stimulation inflammatoire, l'actine située au niveau du cortex cellulaire des CE, forme des fibres de tensions. Une fois associées avec les myosines, elles génèrent une force centripète responsable de la formation de brèches dans la paroi endothéliale (Dudek et Fields, 2001; Dudek et Garcia, 2001). Cet arrangement du cytosquelette découle de l'action des protéines Rho. La famille Rho est une famille de petites protéines G apparentées à Ras et comptant plus d'une dizaine de membres dont principalement, Rho, Rac et Cdc42. Ces GTPases sont impliquées dans de nombreux processus comme la polymérisation des fibres de tension, la phosphorylation de la chaîne légère des myosines (MLC) nécessaire à la contraction cellulaire (Amano et al., 1997). De surcroît, les protéines Rho assurent le regroupement d'ICAM-1 à la surface des HUVECS, étape nécessaire à l'adhésion des monocytes (Wójciak-Stothard et al., 1999). Une augmentation d'ICAM a été décrite dans les formes d'HTAP avec une composante inflammatoire majeure. En effet, des taux élevés d'ICAM circulant ont été observés chez des patients ayant une HTAP associée à une sclérodémie ou

dans la drépanocytose.

## 4.2 VCAM

VCAM ou Vascular Cellular Adhesion Molecule est une protéine impliquée dans le phénomène d'adhésion cellulaire. Elle est essentiellement exprimée par les cellules endothéliales.

Les VCAM-1 (CD106) présente une large portion extracellulaire composée de 7 domaines homologues aux immunoglobulines (Carter et al., 2001). Lorsqu'elle est glycosylée, VCAM-1 peut atteindre une masse moléculaire de 110 kDa. Faiblement exprimée à la surface des CE, son expression peut être amplifiée au niveau transcriptionnel par l'action de certains stimuli inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-4. Son ligand principal est l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . Cependant, elle reste capable de lier les intégrines  $\alpha 4\beta 7$ ,  $\alpha 9\beta 1$  et  $\alpha D\beta 2$ . Ces intégrines, exprimées à la surface des leucocytes, permettent l'adhésion ferme de ces derniers en se liant aux molécules VCAM-1 exprimées à la surface des CE.

## 5. Les médiateurs de la coagulation

La coagulation sanguine est un processus physiologique complexe aboutissant à la formation d'un caillot sanguin, visant à empêcher l'hémorragie au niveau d'une brèche vasculaire. Elle correspond à une cascade de réactions enzymatiques aboutissant à la transformation par la thrombine, du fibrinogène soluble en fibrine insoluble qui constitue l'armature du caillot. Ce phénomène est localisé et régulé par un ensemble d'inhibiteurs physiologiques. Les dérèglements de ce système exposent à un risque de thrombose ou à un risque hémorragique.

L'endothélium a un rôle clé dans le contrôle de l'hémostase en ayant un effet sur ses principaux acteurs : les plaquettes, les facteurs de coagulation et la fibrinolyse. Lors de processus de coagulation, les CE sont multifonctionnelles. Tout d'abord, elles sont anti-thrombotiques : les CE préviennent l'activation de la coagulation et des plaquettes, en s'interposant de façon ininterrompue entre le sang et les substances sous-endothéliales pro-coagulantes.

Elles ont également une fonction pro-thrombotique : suite à l'activation de la coagulation, elles deviennent le support de réactions de la cascade de la coagulation. Enfin, ces cellules ont des propriétés de synthèse extrêmement importantes.

En situation normale, il existe un équilibre entre la thrombose et les systèmes anti-thrombotiques et fibrinolytiques. Dans l'HTAP, l'activité pro-coagulante et la fonction fibrinolytique de l'endothélium pulmonaire sont altérées, d'où la formation de micro-thrombus dans les vaisseaux pulmonaires des patients. La dysfonction endothéliale semble donc contribuer au processus thrombotique caractéristique de la plupart des HTAP.

L'endothélium joue un rôle prépondérant dans le maintien de la coagulation normale par l'action de diverses substances telles que les facteurs humoraux, les héparanes sulfates, la thrombomoduline (récepteur membranaire de la thrombine), l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), l'activateur de type urokinase du plasminogène (uPA) ou encore le facteur Willebrand (vWF).

La tendance thrombogène est favorisée par un déficit relatif des molécules anti-thrombotiques, de prostacycline et du NO (respectivement deux inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire) mais également par une lésion des vaisseaux pulmonaires et le ralentissement du flux sanguin dans la circulation pulmonaire secondaire (Bath et al., 1991; Zanjani, 2012).

*In situ*, la thrombose artérielle pulmonaire pourrait être initiée ou aggravée par des anomalies de la cascade de coagulation, des CE ou des plaquettes. Il a été démontré chez les patients atteints d'HTAP, que la coagulation intravasculaire était un processus continu, se caractérisant par un taux plasmatique élevé de fibrinopeptide A et de D-dimères.

Les lésions thrombotiques organisées au niveau des lésions vasculaires pulmonaires conduisent au remodelage pulmonaire, au rétrécissement du calibre des vaisseaux, aggravant ainsi l'HTAP.

### 5.1 Le système plasmine-plasminogène

La formation du caillot sanguin est due à un déséquilibre entre la coagulation et la fibrinolyse en faveur d'une coagulation accrue et/ou une fibrinolyse déficiente (Dastre, 1893). Actuellement, on sait que la réaction fondamentale du système fibrinolytique est l'activation localisée du plasminogène en plasmine au niveau d'un séquestre hémostatique. Les activateurs essentiels du plasminogène sont le t-PA ou activateur tissulaire du plasminogène et l'urokinase (u-PA), elle-même dérivée d'une pro-urokinase.

Les CE ont la capacité de synthétiser entre autre, le t-PA, ainsi que son inhibiteur, la protéine PAI-1 (plasminogen activateur inhibiteur-1). Afin de maintenir une action locale, le t-PA ne peut activer le plasminogène que s'il est lié à la fibrine donc au sein d'un caillot. Les autres niveaux de régulation se font par élimination de la plasmine libre et par les inhibiteurs des activateurs du plasminogène (Figure 16).

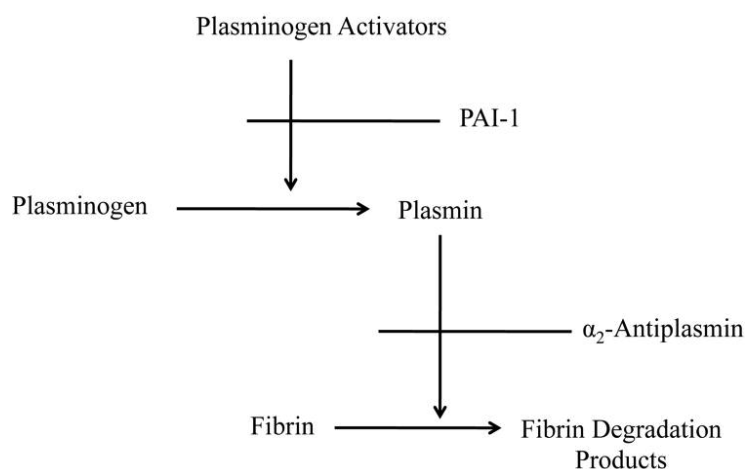


Figure 16 : Le système d'activation du plasminogène (Miles et al., 2014)

Les inhibiteurs des activateurs du plasminogène circulent en grande quantité dans le sang et inhibent immédiatement le t-PA s'il n'est pas lié à la fibrine (Lebrazi et al., 2003). Par ailleurs, dans les CE des patients atteints d'HTAP, la thrombomoduline comme le PAI-1, qui inhibent la formation de fibrine et fibrinolyse, sont sous-exprimées (Welsh et al., 1996). Il y a bien des anomalies du système (tPA) plasmine et du système (uPA) plasmine (Kouri et al., 2008; Lannan et al., 2014). Il existe également une réduction des facteurs anti-thrombotiques et des taux élevés de PAI-1 et de thromboxane A2 dans le plasma des patients ayant une HTP (Christman et al., 1992).

### 5.2 Anomalie de coagulation dans l'HPPE

Bien que l'HPPE soit un trouble thrombo-embolique, aucun facteur plasmatique ou de défauts dans la fibrinolyse n'ont été identifiés. En comparant à la population générale, aucune augmentation de la prévalence de la mutation F5 R506Q (facteur V Leiden) n'a été trouvée chez des patients souffrant d'HPPE (Lang et al., 1996; Wolf et al., 2000). D'autres facteurs de risque de thrombose héréditaire, telles que les carences en antithrombine, en protéine C, protéine S ou de mutation F2 G20210A (gène de la prothrombine) (Wolf et al., 2000) n'ont été associés à l'HPPE. Les efforts déployés pour identifier les défauts fonctionnels (Lang et al., 1994a, 1994b) ou les polymorphismes d'un gène (Suntharalingam et al., 2008) du système vasculaire fibrinolytique du poumon ont été infructueux. De même, aucune modification des taux plasmatiques de l'inhibiteur/activateur du plasminogène de type 1 ni de l'activateur tissulaire du plasminogène n'a été associée à l'HPPE (Olman et al., 1992). Cependant, la présence d'un anticoagulant lupique et des anticorps anti-phospholipides ont été observés dans environ 20% des cas d'HPPE (Bonderman et al., 2009; Wolf et al., 2000). En outre, l'association des transporteurs de phospholipides et la thrombocytopenie induite par l'héparine ont été observés dans l'HPPE (Auger et al., 1995).

### 5.3 Fibrinogène et HPPE

Selon une théorie actuelle, la non résolution des séquestres dans l'HPPE serait due à une modification du fibrinogène et ceci provoquerait une résistance de la fibrinolyse des embolies.

Dans une étude récente, une différence significative a été démontrée dans le génotype FGA Thr312A et les fréquences alléliques entre les patients porteurs d'HPPE et les contrôles (Suntharalingam et al., 2008). Dans une étude, il a été montré que l'allèle du fibrinogène FGA T312A augmenterait de manière accrue le risque de thrombo-embolie veineuse (Le Gal et al., 2007). En parallèle, il a été montré que l'allèle F13 34Leu induirait un risque significativement plus faible de développer une thrombo-embolie veineuse. Un autre groupe a constaté la présence de variants du fibrinogène avec les mutations des gènes hétérozygotes correspondants (dysfibrinogénémie) chez 5 des 33 patients porteurs d'HPPE: FGB P235L / R375W, FGB P235L / Y114H, FGB P235L, FGA L69H et FGA R554H (fibrinogènes San Diego I-V) (Morris et al., 2009). Cependant, la forme allélique FGB P235L a été trouvée chez trois de ces patients de manière indépendante. L'analyse fonctionnelle montre des anomalies dans la structure et / ou la lyse des polymères de fibrine dans toutes les mutations d'HPPE décrites. L'ensemble de ces résultats suggère que, chez certains patients, les différences dans la structure moléculaire de la fibrine peuvent être impliquées dans le développement de l'HPPE après un épisode d'embolie aiguë. Ces altérations moléculaires (Morris et al., 2009) sont associées à une résistance de la thrombolyse (Morris et al., 2006) et par une sialylation anormale du fibrinogène chez les patients (Morris et al., 2007). Une glycosylation anormale des protéines de la membrane cellulaire expliquerait aussi pourquoi l'HPPE est plus fréquente chez les patients de groupes sanguins non-O (Bonderman et al., 2009).

#### 5.4 La Thrombomoduline

La thrombomoduline est une glycoprotéine membranaire produite par la CE. Elle est la résultante de la liaison de la thrombine à son récepteur membranaire endothélial qui conduit à l'activation de la protéine C anti-coagulante. Plusieurs études ont attestées d'une réduction des taux de thrombomoduline chez les patients atteints d'HTAP suggérant l'altération de l'hémostase (Welsh et al., 1996).

#### 5.5 Le facteur von Willebrand (vWF)

Le facteur vWF est une grande glycoprotéine multimérique, synthétisée par l'endothélium et les mégacaryocytes. Il est présent dans le plasma, les plaquettes et l'endothélium. Dans le plasma, il

circule lié au facteur anti-hémophilique A (facteur VIII ou FVIII) qu'il protège contre la protéolyse. Ainsi, une diminution importante du facteur von Willebrand entraînera une diminution du FVIII. Dans les CE, les corps de Weibel-Palade stockent à la fois le vWF et la P-sélectine. Lors de perturbation de l'endothélium, le vWF est libéré. Les vWF fonctionnels se lient au collagène dans les zones de lésions vasculaires et initient la formation d'agrégats plaquettaire. Des taux plasmatiques augmentés de l'antigène vWF chez des patients atteints d'HTAP démontrent davantage l'altération de l'hémostase et le dysfonctionnement endothélio-plaquettaire dans cette maladie. De plus, des taux élevés de vWF ont été corrélés avec la mortalité des patients ayant une HTP (Lopes et al., 2000a).

### 5.6 La perte de la fonction de barrière endothéliale

L'endothélium est en permanence sous l'influence de pressions hémodynamiques (*shear stress*), de la pression partielle en O<sub>2</sub>, d'hormones ou encore de médiateurs paracrines ou endocrines. Une de ses nombreuses vocations est d'assurer la protection des couches vasculaires sous-jacentes et de certains facteurs circulants.

Des lésions directes de l'endothélium, une forte production de VEGF par l'épithélium alvéolaire ou d'autres types cellulaires peuvent provoquer un changement de la perméabilité des CE. Par ailleurs, en réponse aux différents signaux communicatifs, les CE peuvent proliférer, migrer, libérer des facteurs ou entrer en apoptose, entraînant l'altération des fonctions hémostatiques de l'endothélium, incluant le contrôle de la coagulation et la production de facteurs de croissance et de substances vasoactives (Lopes et al., 2000b).

Grâce à des jonctions intercellulaires, la présence de protéines de liaison à la surface des cellules, des charges électrostatiques de la membrane endothéliale et la composition de la membrane basale, l'endothélium a une fonction de barrière entre le sang et les tissus adjacents aux vaisseaux sanguins. Ces éléments régulent l'intégrité et la perméabilité de l'endothélium.

Dans l'HTP, il y a une augmentation de la diffusion des macromolécules à travers les jonctions endothéliales. Celle-ci est causée par des médiateurs inflammatoires comme la thrombine ou l'histamine (Lum et Malik, 1996), mais également le stress mécanique. Tous ces stress peuvent induire des changements morphologiques des CE ainsi que l'élargissement des jonctions

intercellulaires. Par conséquent, une forte augmentation de la perméabilité endothéliale est observée avec comme conséquence la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale.

Les médiateurs prolifératifs ont l'opportunité d'être en contact direct avec le sous-endothélium conduisant à la prolifération cellulaire des couches vasculaires de l'adventice et de la média.

A l'état normal, les plaquettes n'interagissent pas avec la CE. Elles le feront secondairement à la production de vasomédiateurs. Par contre dans l'HTAP, les plaquettes viennent en contact avec les structures sous-endothéliales ce qui va réduire la libération de vasomédiateurs et de facteurs de croissances tels que la sérotonine et va provoquer des changements de l'HTAP (Budhiraja et al., 2004).



# Chapitre 4 : Traitement dans l'HPPE

## I. Traitements médicaux

Actuellement, l'HPPE est une maladie curable chirurgicalement. Malgré les progrès qui ont rendu l'endartériectomie pulmonaire disponible à plus de patients souffrant d'HPPE, il persiste un nombre important de patients inopérables, ou qui renoncent à la chirurgie, ou qui ont une HTP persistante après la chirurgie. Selon le registre européen de l'HPPE, 31% des patients ayant une HPPE référés aux centres spécialisés ont été jugés inopérables et 17% des patients présentaient une HTP post-opératoire persistante (Pepke-Zaba et al., 2011). Dans ces cas, il convient d'envisager un traitement médical. Le but de la thérapie médicale dans l'HPPE est d'utiliser des vasodilatateurs pulmonaires et/ou des agents de remodelage visant à réduire à la fois la pression artérielle pulmonaire et les RVP, afin d'améliorer le statut et la qualité de vie des patients. Cependant, les avantages de la thérapie médicale sont de petite taille par rapport à une endartériectomie pulmonaire réussie, et le traitement médical n'est pas curatif.

Le traitement médical pour l'HPPE implique l'utilisation de médicaments initialement développés pour traiter l'HTAP, et ce raisonnement est basé sur l'observation de patients pouvant présenter une artériopathie distale significative. C'est une cause fréquente empêchant ces patients d'être opérés. Il existe une littérature bien établie attestant de l'innocuité et de l'efficacité des analogues de la prostacycline, des antagonistes des récepteurs de l'endothéline et des inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 dans le traitement de l'HTAP, et par conséquent elles ont été appliquées à l'HPPE (Delcroix et al., 2013). À ce jour, il y a eu deux grands essais randomisés utilisant le traitement médical dans l'HPPE.

### 1. Les antagonistes des récepteurs de l'ET : le Bosentan

Le premier a été l'essai BENEFIT (effets du Bosentan dans les formes inopérables de l'hypertension pulmonaire thromboembolique chronique). BENEFIT était une étude en double aveugle, randomisée, avec un contrôle placebo impliquant 157 patients souffrant d'HPPE inopérable ou avec une HTP post-opératoire persistante plus de six mois après une

endartériectomie pulmonaire. Les patients ont été randomisés pour recevoir le Bosentan, un antagoniste des récepteurs de l'endothéline, ou un placebo pendant 16 semaines.

Le Bosentan (Tracleer®) découvert en 1994, est un antagoniste non peptidique des récepteurs de l'endothéline. Il s'agit du 1er antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline, administrable par voie orale et utilisé dans le traitement de l'HTAP. Il agit au niveau de la liaison de l'endothéline à ses récepteurs et bloque ainsi leur action. En effet, il s'agit d'un inhibiteur compétitif des récepteurs de l'endothéline. Il entraîne la relaxation du muscle lisse vasculaire et par conséquent une vasodilatation conduisant à la diminution des résistances vasculaires pulmonaires et systémiques et atténuant les effets de l'HTAP sur la restructuration vasculaire (Liu et al., 2013) (Jais et al., 2008). Le Bosentan est un composé stable à l'état solide, faiblement soluble dans l'eau et n'est pas détérioré par la lumière.

Dans l'étude, les principaux effets obtenus furent un changement des RVP à l'état basal et un changement de la distance du test de marche (Jais et al., 2008). Un des buts principaux a été atteint avec une diminution de 24% des RVP observés chez les patients traités par Bosentan versus placebo. Plusieurs paramètres hémodynamiques sont également améliorés, y compris la résistance pulmonaire totale (RPT) et l'index cardiaque. Des études ultérieures confirment ces résultats. Becattini et ses collègues ont montré que des patients ayant une HPPE et traités au Bosentan ont eu une augmentation de leur distance au test de marche et de l'index cardiaque, et une diminution de la pression artérielle pulmonaire, après 3 à 6 mois de traitement (Becattini et al., 2010).

## 2. Le Riociguat

La deuxième grande étude randomisée réalisée est l'étude CHEST-1 publié en 2013. CHEST-1 a été un essai clinique de phase 3, multicentrique, randomisé, en double insu, avec un contrôle par placebo. 261 patients atteints d'HPPE inopérable ou d'HTP persistante après endartériectomie pulmonaire ont été traités avec le Riociguat, un stimulateur soluble du guanylate cyclase.

Le Riociguat est un stimulateur direct de la guanylate cyclase soluble (sGC), enzyme présente dans le système cardio-pulmonaire et récepteur du NO. Lorsque le NO se lie à la sGC, l'enzyme catalyse la synthèse du GMPc. Le GMPc intracellulaire joue un rôle important au niveau de la régulation de processus qui influencent le tonus vasculaire, la prolifération, la fibrose et

l'inflammation (Montani et al., 2014). L'HTAP est associée à une stimulation insuffisante de la voie NO-sGC-GMPc. Le Riociguat a un double mode d'action. Il sensibilise la sGC au NO endogène en stabilisant la liaison NO-sGC. Le Riociguat stimule également directement la sGC indépendamment du NO. Il rétablit la voie NO-sGC-GMPc et aboutit à une production intracellulaire accrue de GMPc.

Après 16 semaines de traitement, les patients traités par Riociguat ont montré une augmentation significative de 39 mètres en moyenne au test de marche par rapport aux patients recevant le placebo. Les RVP et les taux de NT-proBNP ont également été améliorés de manière significative dans le groupe traité par rapport au placebo (Ghofrani et al., 2013). Des effets indésirables minimes ont été observées, avec 3% des patients développant une insuffisance cardiaque droite et 2 à 3% présentant des syncopes tant pour le placebo que dans le groupe traité (Simonneau et al., 2015). Le Riociguat est actuellement approuvé pour augmenter la tolérance dans l'exercice chez les patients atteints d'HPPE inopérables ou ayant une HTP persistante post-endartériectomie pulmonaire aux États-Unis et en Europe.

### 3. Les inhibiteurs de phosphodiesterases : le Sildénafil

Il n'y a pas d'autres grands essais randomisés utilisant le traitement médical dans l'HPPE. Suntharalingam et ces associés ont effectué une étude en double aveugle, randomisée, et ayant pour contrôle un placebo. 19 patients ayant une HPPE inopérable sont traités au Sildénafil (Suntharalingam et al., 2008).

Le Sildénafil (Revatio®) administré par voie orale, est un inhibiteur de la PDE-5 qui augmente les concentrations de GMPc dans les CML, résultant en une relaxation et une vasodilatation (Galie et al., 2005). Il facilite donc les effets anti-prolifératif et vasodilatateur du NO (Weimann et al., 2000). Il est actuellement utilisé dans le traitement de l'HTAPi chez les patients en classe fonctionnelle II et III selon la classification de l'OMS. Par ailleurs, le Sildénafil peut être efficace dans le traitement de l'HTP autre qu'idiopathique.

Après 12 semaines de traitement, aucune différence significative n'a été observée dans leur critère principal qui était le test de marche. Toutefois, il y avait des améliorations significatives au niveau des RVP. L'étude a été étendue à un an, après quoi des améliorations significatives ont

été observées au test de marche, de l'hémodynamique et de la qualité de vie (Suntharalingam et al., 2008 ; Ghofrani et al., 2003 ; Reichenberger et al., 2007).

#### 4. Prostaglandines prostanoides (époprosténol-tréprostiniil-iloprost)

Au cours des années, la compréhension et la prise en charge de l'HTAP ont progressé de façon impressionnante, favorisés par un certain nombre d'essais cliniques démontrant l'efficacité de plusieurs thérapies ciblant spécifiquement les anomalies présentes dans l'HTAP. Les travaux de recherche sur les thérapies vasodilatatrices ont mené au développement de nouvelles molécules aux propriétés vasodilatatrices et anti-prolifératives sur les vaisseaux pulmonaires. De tels agents aux propriétés mixtes incluent la prostacycline et ses analogues, les antagonistes des récepteurs de l'endothéline et les inhibiteurs de phosphodiésterases.

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>), produite par les CE, entraîne une relaxation du muscle lisse vasculaire et une inhibition de l'agrégation plaquettaire par le biais d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc.

En outre, plusieurs petites études ont été réalisées pour étudier l'utilisation de prostanoides dans l'HPPE.

##### 4.1 Epoprosténol

L'époprosténol de sodium (prostaglandine I<sub>2</sub> ou prostacycline PGI<sub>2</sub>, Flolan®) est une prostaglandine endogène dérivée du métabolisme des acides aminés par la voie de la cyclo-génase dans l'endothélium vasculaire. La PGI<sub>2</sub> agit en se liant à un récepteur couplé aux protéines G qui produit une augmentation des concentrations de l'AMPc via l'activation de la protéine kinase A. Cette cascade a pour effet physiologique une vasodilatation, une inhibition de la sécrétion de l'endothéline, de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion leucocytaire à l'endothélium.

Cabrol et ses collègues ont revu rétrospectivement 27 patients ayant une HPPE inopérables traités par époprosténol par voie intraveineuse et ont constaté des améliorations significatives au test de marche, de la classe fonctionnelle NYHA et de la PAPm après une période moyenne de 20 mois de traitement (Cabrol et al., 2007).

#### 4.2 Tréprostinil ou UT-15

Le treprostinil (UT-15, Remodulin®) est un analogue tricyclique de la prostacycline, appartenant à la classes des benzindènes et aux actions anti-plaquettaires et vasodilatatrices (Vachierey et al., 2004). Le treprostinil est utilisé pour traiter l'HTAP. Cette prostanoloïde est rapidement et complètement absorbée après administration sous-cutanée afin d'éviter les risques encourus via l'administration intra-cutanée. Le métabolisme de tréprostinil est hépatique, bien que les enzymes impliquées ne soient pas exactement connus. C'est pourquoi cette molécule pourrait bénéficier d'un rôle en tant qu'agent anti-ulcéreux et anti-asthmatique par ses capacités d'inhibition de sécrétions gastriques et de bronchodilatation. Environ 79% de la dose administrée est excrétée dans l'urine soit sous forme inchangée (4%) ou un métabolite identifiable (64%) (Skoro-Sajet et al., 2008). Un essai non contrôlé par Skoro-Sajer au treprostinil introduit sous-cutanée chez 25 patients ayant une HPPE inopérable a également montré une amélioration significative au test de marche et de l'hémodynamique après une période moyenne de 19 mois (Skoro-Sajer et al., 2007).

#### 4.3 Iloprost

L'Iloprost (Ilomdène, Ventavis®) est un analogue chimiquement stable de la prostacycline (Olschewski et al. 2001). Il se présente comme un puissant vasodilatateur pulmonaire et antiagrégant plaquettaire chez les patients atteints d'insuffisance respiratoire aigüe, de fibrose ou d'HTAP sévère. Ses actions sont similaires à celle de l'époprosténol IV (Higenbottam et al., 1998). Cependant, sa stabilité chimique est meilleure que l'époprosténol.

Une inhalation d'iloprost, engendre une vasodilatation pulmonaire similaire à celle de l'époprosténol, avec une action durant 30 à 90 minutes (Olschewski et al., 1996). Enfin, l'iloprost inhalé a montré une amélioration de l'hémodynamique et de l'état fonctionnel dans l'HPPE (Olschewski et al., 2002 ; Ghofrani et al., 2002 ; Kramm et al., 2003).

## II. Traitements chirurgicaux

L'HPPE est curable chirurgicalement grâce à l'endartériectomie pulmonaire. Dans certains cas, les patients subiront d'autres types de traitements chirurgicaux comme la transplantation cardio-pulmonaire ou l'angioplastie pulmonaire (Mayer et al., 2011). Ce type de chirurgie n'est réalisé que dans des centres spécialisés comme l'Hôpital Marie Lannelongue.

### 1. Thrombo-endartériectomie ou endartériectomie pulmonaire

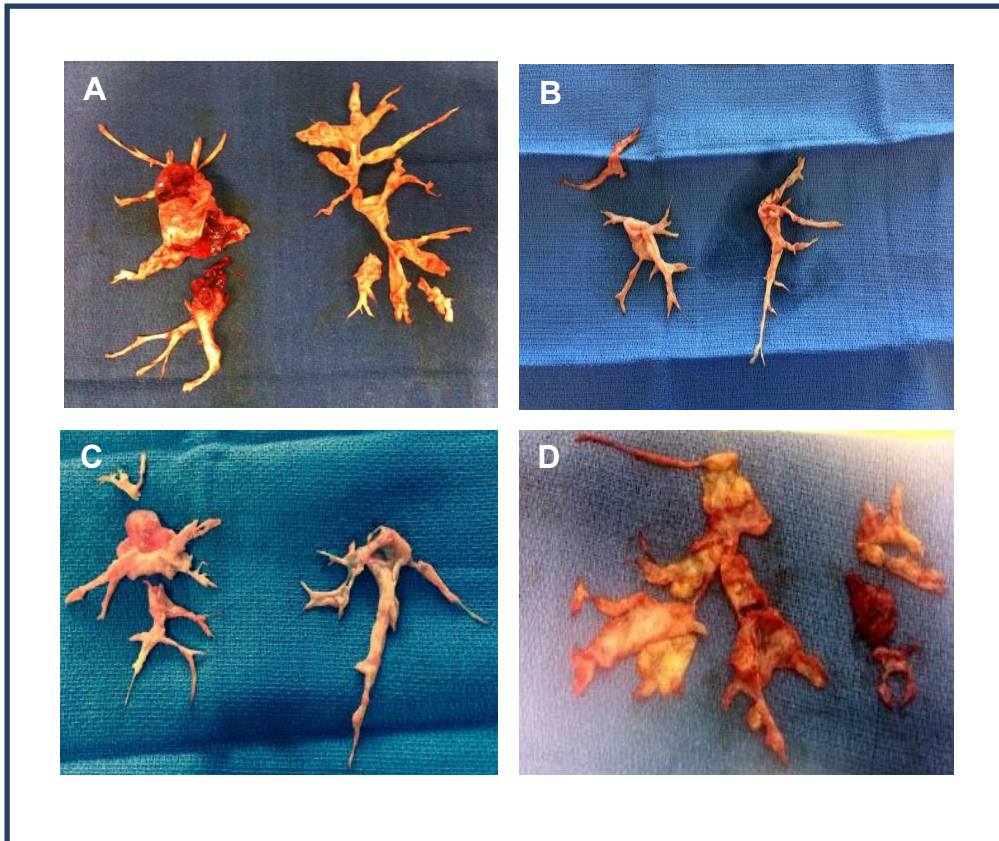
L'HPPE est une des hypertensions les plus fréquentes et pour laquelle un traitement chirurgical curatif existe (Fadel et al., 2008; Vuylsteke et al., 2011).

Cette technique chirurgicale, décrite pour la première fois dans les années 1980, est destinée uniquement aux patients souffrant d'HPPE (Moser et al., 1983). Quand cette technique est possible, elle permet un rétablissement définitif des fonctions cardiaques et respiratoires pour les patients souffrant d'HPPE (Dartevelle et al., 2004b; Mauritz et al., 2012; Reesink et al., 2007; Sato et al., 2013).

Cette technique se réalise sous circulation extracorporelle et permet de désobstruer chaque AP (gauche et droite) ainsi que ces branches lobaires, segmentaires et sous-segmentaires oblitérées par un séquestre (Madani et al., 2012). Cette technique permet d'obtenir une diminution immédiate d'au moins 50% des résistances vasculaires pulmonaires (Condliffe et al., 2008; de Perrot et al., 2011). L'endartériectomie pulmonaire est actuellement le traitement de choix de l'HPPE. En rétablissant une circulation pulmonaire normale, elle permet la normalisation de l'hémodynamique cardiaque et la disparition des signes fonctionnels liés à l'insuffisance cardiaque (Freed et al., 2008). Elle permet donc une guérison des patients au prix d'un traitement anticoagulant au long cours (Ogino et al., 2006). Les deux principales complications opératoires sont les hémorragies et les oedèmes de reperfusion (Fadel et al., 2008; Saouti et al., 2009).

A la suite de cette intervention chirurgicale, une classification per-opératoire des séquestres peut être établie. La première classification a été réalisée en 2002 par Jamieson (Thistlethwaite et al., 2002). Quatre types de séquestres ont été décrits. Le type 1 correspond à la présence de thrombus frais dans les artères lobaires (Figure 17A). Le type 2 correspond à un épaississement intimal fibreux proximal (Figure 17B). Le type 3 correspond à une atteinte intimale fibreuse distale

(Figure 17C). Le type 4 correspond à une artériolite distale sans séquestre thrombo-embolique visible (Figure 17D). Les formes proximales, type 1 et 2, sont corrélées à de meilleurs résultats hémodynamiques post-opératoire en comparaison des formes distales, types 3 et 4 (Thistlethwaite et al., 2002).



**Figure 17 : Formes clinico-chirurgicales d'HPPE**

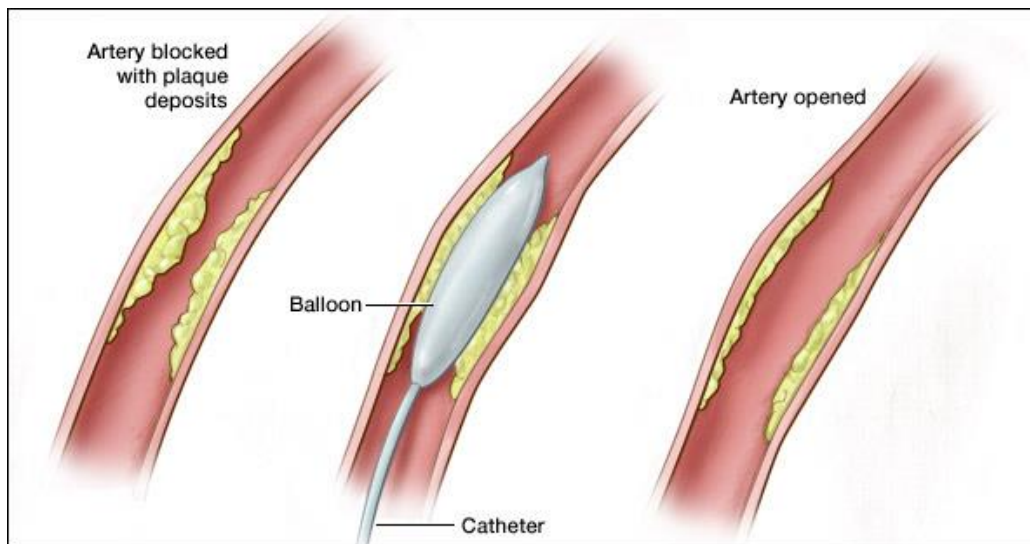
## 2. Angioplastie pulmonaire

Le traitement de référence des patients souffrant d'HPPE est l'endartériectomie mais seuls 60% de ces patients peuvent être opérés laissant aux patients inopérables un pronostic sombre (Andreassen et al., 2013; Feinstein et al., 2001). Les équipes japonaises ont proposé une technique percutanée de désobstruction par angioplastie au ballon sur les lésions segmentaires et sous-segmentaires pour les patients inopérables (Feinstein et al., 2001). L'angioplastie pulmonaire est une technique innovante dans le traitement des patients souffrant d'une HPPE. Cette technique est destinée aux patients ne pouvant être opérés car leurs lésions sont trop distales ou due à l'existence de comorbidités du patient ou alors aux patients ayant une HPPE symptomatique persistante après avoir subi une endartériectomie des artères pulmonaires (Inami et al., 2013; Ogawa et Matsubara, 2015).

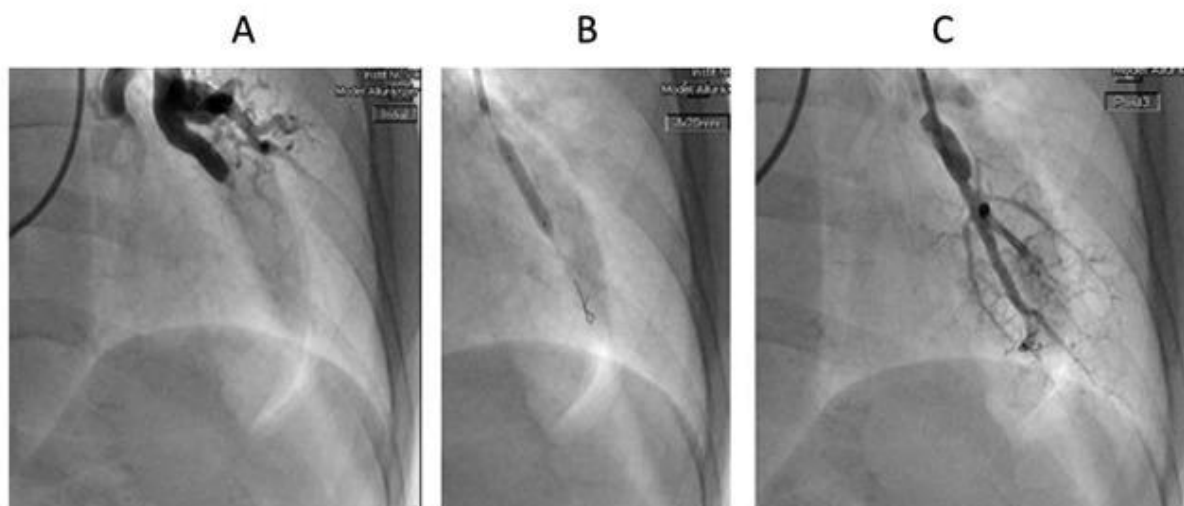
Cette procédure est réalisée en plusieurs séances sous anesthésie locale par un radiologue interventionnel spécialisé. Elle cible principalement les artères pulmonaires segmentaires et sous-segmentaires qui sont le siège de lésions sténosantes locales (Figure 18 et 19) (Kataoka et al., 2012; Sugimura et al., 2012).

Les patients bénéficient d'une ou deux séances par semaine ou par mois. Selon différentes équipes, ce traitement permettrait une amélioration de la fonction et de l'hémodynamique de façon rapide et prolongée et avec une diminution de 60% des résistances pulmonaires. La principale complication de ces procédures est l'œdème pulmonaire. Cette technique est innovante et améliore les chances de pronostic des patients inopérables, toutefois celle-ci nécessite d'être validée et standardisée afin de figurer dans la liste des traitements usuels pour cette pathologie sévère (Fukui et al., 2015; Mizoguchi et al., 2012).





**Figure 18 : Principe de l'angioplastie pulmonaire**



**Figure 19 : Angiographie pulmonaire montrant la procédure d'angioplastie pulmonaire (Tsuji et al., 2014).**

La figure A montre l'occlusion totale de l'artère lobaire inférieure avant la procédure d'angioplastie pulmonaire. La figure B montre le ballon dans l'artère lobaire inférieure durant la procédure. La figure C montre la revascularisation après la procédure.

### 3. Transplantation pulmonaire

Avant l'arrivée de l'endartériectomie pulmonaire, le seul traitement chirurgical de l'HPPE était la transplantation cardio-pulmonaire. A l'heure actuelle, les transplantations bi-pulmonaires ou cardio-pulmonaires chez les patients souffrant d'HPPE sont devenues rares. La transplantation est une opération extrêmement lourde et contraignante au long terme pour le patient. Cette alternative thérapeutique est réservée aux patients jeunes en défaillance cardiaque et pour qui l'endartériectomie a échoué ou est impossible. Toutefois, le taux de survie à 5 ans s'améliore passant de 50% à 75% dans certaines études (Toyoda et al., 2008; Trulock et al., 2006). La faible disponibilité des greffons, l'augmentation de la prévalence de l'HPPE, les complications ainsi que la mortalité élevée après la transplantation pulmonaire (environ 20%) ont été des arguments pour développer au plus vite une alternative comme l'endartériectomie pulmonaire ou l'angioplastie.

A l'heure actuelle, la transplantation pulmonaire ou cardiopulmonaire est proposée aux patients qui ont une hypertension pulmonaire persistante et grave après chirurgie ou qui ne peuvent pas bénéficier d'une endartériectomie pulmonaire dû à une maladie distale.

Le Professeur Fadel et ces collègues ont rapporté 219 patients ayant subi une greffe bi-pulmonaire ou cardio-pulmonaire pour une hypertension pulmonaire, dont 21 souffraient d'HPPE. Parmi ces patients, onze ont subi une transplantation coeur-poumon et dix ont reçu une greffe des poumons.

La survie globale pour les patients atteints d'HPPE était de 76% à 1 an et 57% à 5 ans, sans différence de survie entre les transplantés cœur-poumon ou bi-poumon. En raison de la rareté des organes disponibles, la mortalité post-opératoire élevée et les risques associés à l'immunosuppression à vie, la transplantation ne doit être considérée comme un dernier recours pour les patients atteints d'HPPE.

## Chapitre 5 : Modèles expérimentaux dans l'HPPE

Pour améliorer les connaissances sur la physiopathologie de l'HPPE, des efforts considérables ont été déployés pour tenter de développer des modèles animaux fiables. L'embolie pulmonaire aiguë est facilement reproduite dans plusieurs espèces animales. En revanche, l'induction d'une pathologie reproduisant toutes les composantes de l'HPPE s'est révélée difficile. Pour avoir un bon modèle, celui-ci devrait présenter les caractéristiques suivantes : l'organisation et la persistance d'un caillot, l'hypertension pulmonaire, l'obstruction pulmonaire chronique de l'AP par un matériau intraluminal, le développement d'une circulation systémique dans les régions pulmonaires ischémiques, une vasculopathie pulmonaire dans les territoires non obstrués et des anomalies biologiques comme chez l'Homme (augmentation de la production d'ET-1 ou de facteurs de croissance clés) et un remodelage du ventricule droit. Dans cette partie, tous les modèles animaux reproduisant l'HPPE pour étudier la pathogenèse seront décrits (tableau 1 et 2) (Mercier et Fadel, 2013). Tous les modèles d'HPPE sont obtenus chirurgicalement.

### I. Modèles animaux de thrombose intravasculaire persistante

Les mécanismes pour lesquels le caillot n'est pas lysé mais va plutôt s'organiser en tissu fibreux, restent inconnus. Toutefois, les hypothèses les plus admises concernant l'organisation et la persistance de ce séquestre sont des anomalies des CE pulmonaires et/ou des défauts dans le processus de réparation vasculaire (Egermayer, 2000; Lang, 2010).

63% des patients souffrant d'HPPE n'ont pas d'histoire d'embolie pulmonaire aiguë, ceci peut s'expliquer par une dysfonction endothéliale provoquant cette thrombose in situ (Hoeper et al., 2006). Cette hypothèse n'a jamais été vérifiée chez l'animal. En revanche, le processus d'organisation d'un séquestre a déjà été étudié dans des modèles animaux fiables, à bas débit et induit par thrombose de la veine cave inférieure (tableau 2) (Modarai et al., 2008; Waltham et al., 2003). Les rongeurs sont soumis à une laparotomie médiane en vue d'atteindre la veine cave inférieure puis elle sera disséquée au niveau des veines rénales, puis ligaturée en dessous des veines rénales (Figure 20).

La plupart de ces modèles animaux ont été développés chez des rongeurs dans le but d'étudier

la résolution d'un thrombus veineux (Humphries et al., 1999; McGuinness et al., 2001; Modarai et al., 2005a, 2005b; Singh et al., 2003). La thrombose peut être induite par stase veineuse seule ou combinée à une hypercoagulabilité sanguine induite ou par des dommages mécaniques de l'endothélium.

Kang et son équipe ont étudié un modèle porcin de thrombose de la veine jugulaire après sténose et lésions endothéliales mécaniques (Fowlkes et al., 1998; Kang et al., 2003). L'occlusion de la veine cave inférieure a également été étudiée chez des singes (Fowlkes et al., 1998). Cependant, les souris et les rats restent les animaux les plus utilisés en raison du coût-efficacité dans cette recherche (Modarai et al., 2005b). Les modèles de rongeurs à faible débit présentent un thrombus laminaire qui se résout dans les 3 à 4 semaines par l'intermédiaire d'un processus de recanalisation qui nécessite le recrutement de cellules inflammatoires et des signaux angiogéniques (Henke et al., 2001, 2004; Varma et al., 2003; Wakefield et al., 1995, 1999).

Dans des études sur les facteurs de risque cliniques, l'HPPE n'est associée ni aux anomalies des facteurs plasmatiques dans la thrombo-embolie veineuse ni à un défaut de fibrinolyse. Toutefois, les patients ayant un shunt ventriculo-auriculaire ou des antécédents d'infection d'un stimulateur cardiaque augmentent le risque d'HPPE (Bonderman et al., 2005, 2009).

Cette découverte a conduit les études sur des modèles animaux. Bonderman et son équipe ont utilisé un modèle de souris afin de leur induire une thrombose veineuse par sténose de la veine cave inférieure et par des dommages de l'endothélium afin d'étudier le rôle de l'infection à staphylocoques dans le retard de résolution de thrombus et de l'expression des molécules pro-fibrosantes (Bonderman et al., 2008).

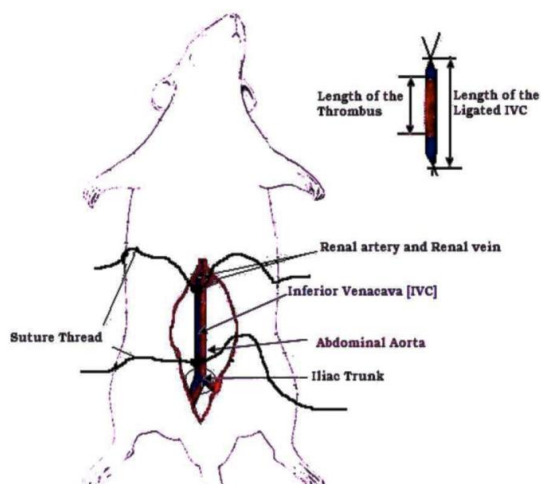


Figure 20 : Modèle de ligature de la veine cave inférieure (Viswanatha et al., 2012)

## II. Modèles reproduisant l'obstruction de l'artère pulmonaire

La première tentative pour reproduire l'obstruction chronique de l'AP dans un modèle animal a été réalisée au sein de notre laboratoire dans un modèle porcin par le Pr FADEL et son équipe (Fadel et al., 1998, 1999). Pour cela, ils ont réalisé une embolisation proximale grâce à l'utilisation de coils (dispositif pro-thrombotique) et de colle biologique dans l'AP gauche. Au bout de 5 semaines, l'obstruction chronique de l'AP gauche entraîne une ischémie pulmonaire chronique sans HTP. Il en résulte une augmentation de l'approvisionnement en sang systémique au poumon grâce au développement d'une circulation bronchique médiastinale et intercostale. Il en résulte également une vasculopathie pulmonaire distale post-obstructive (Fadel et al., 2004).

La deuxième tentative a été d'effectuer une ligature qui s'effectue au niveau de l'AP gauche car elle peut être facilement réimplantée dans l'AP principale pour reproduire les lésions de reperfusion après endartériectomie pulmonaire. La réponse vasculaire systémique de l'obstruction vasculaire pulmonaire chronique diffère à travers les espèces. On retrouve un développement du lit vasculaire bronchique dans les voies respiratoires intra-parenchymateuses chez les grands animaux (chiens et les porcelets) et une prolifération des artères intercostales dans la cavité pleurale chez les rongeurs (rats et souris) (Mitzner et Wagner, 2004). Bien que les études sur l'HPPE aient été menées principalement chez le modèle porcin, quelques études sur la circulation bronchique ont été effectuées dans un modèle de ligature de l'AP chez le rat (Wagner et al., 2008, 2011). L'occlusion de l'une des principales artères pulmonaires stimule l'angiogenèse dans les vaisseaux bronchiques des poumons (Charan et Carvalho, 1997).

Les artères bronchiques commencent à se développer 2 à 3 jours après ligature de l'AP et vont venir alimenter la circulation pulmonaire grâce à des anastomoses pré-capillaires. Ces anastomoses peuvent maintenir l'oxygénation de l'épithélium des voies respiratoires, ce qui explique les lésions de reperfusion minimales après ischémie chronique pulmonaire (Fadel et al., 1998).

En plus de l'hypertrophie de la circulation bronchique, la vasculopathie post-obstructive est caractérisée par des altérations structurales des artères pulmonaires comme l'augmentation de l'épaisseur de la media (Fadel et al., 2000), des troubles de la vasoréactivité (Shi et al., 2000), une altération de la fonction du NO synthétisée par la CE (Fadel et al., 2000) et une augmentation de la réactivité à l'endothéline (ET-1) (Shi et al., 1997, 1998) conduisant à une élévation des résistances après la reperfusion (Michel et Hakim, 1991).

La fermeture d'un shunt aorto-pulmonaire reproduit les conditions hémodynamiques des territoires non obstrués après endartériectomie pulmonaire.

La fermeture de ce shunt provoque une normalisation de l'expression de l'ET-1 et de l'ET-A. Il inverse le processus d'hypertrophie de la media dans les artères pulmonaires distales.

### **III. Modèle reproduisant les lésions non obstruées dans l'HPPE**

Au cours de la phase précoce de l'HPPE, les territoires non-obstrués sont soumis à une augmentation chronique du débit de la circulation sanguine. Par conséquent, les modèles de shunts (circulation systémique vers la circulation pulmonaire) ont été utilisés chez les animaux afin de reproduire les lésions observées dans les territoires non obstrués chez les patients atteints d'HPPE (Mercier et al., 2009).

Dans un modèle animal initialement développé par Rendas et al en vue de reproduire une maladie cardiaque congénitale, un shunt aorto-pulmonaire a été induit par l'implantation d'une prothèse courte entre l'aorte ascendante et le tronc de l'AP (Rendas et Reid, 1983; Rendas et al., 1979). Ce modèle a été utilisé pour induire des lésions vasculaires pulmonaires de type hyper débit similaires à ceux observés dans les territoires non-obstrués dans l'HPPE. Une vasculopathie pulmonaire à haut-débit induite par 5 semaines de shunt aorto-pulmonaire a été caractérisée par une augmentation de l'épaisseur de la média des artères pulmonaire distale due

à une prolifération des CML (Rendas et Reid, 1983; Rendas et al., 1979).

#### **IV. Modèle animal reproduisant les caractéristiques de l'HPPE**

Les modèles animaux décrits précédemment fournissent des informations utiles sur la physiopathologie des lésions observées dans les territoires obstrués et non obstrués. Toutefois, ceux-ci ne permettent pas de reproduire les caractéristiques importantes de l'HPPE chez l'Homme comme l'hypertension pulmonaire, les interactions entre les deux compartiments systémiques et pulmonaires et surtout la dysfonction ainsi que le remodelage du ventricule droit.

Depuis les années 1990, plusieurs tentatives pour développer des modèles animaux d'HPPE (Kim et al., 2000b; Marsh et al., 1994; Moser et al., 1973, 1991; Sato et al., 2008, 1995) ont échoué en raison de la lyse du caillot par le système fibrinolytique endogène (Lang et al., 1993) et des capacités d'adaptation remarquables de la circulation pulmonaire.

Ainsi, 3 h après l'embolie pulmonaire aiguë chez le chien (Moser et al., 1991), seulement 30% du volume de thrombus injecté initialement est resté à l'intérieur de l'artère pulmonaire.

L'injection d'acide tranexamique (Moser et al., 1991) ou d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 (Marsh et al., 1994) afin de retarder la résorption du thrombus n'a pas réussi à résoudre le problème.

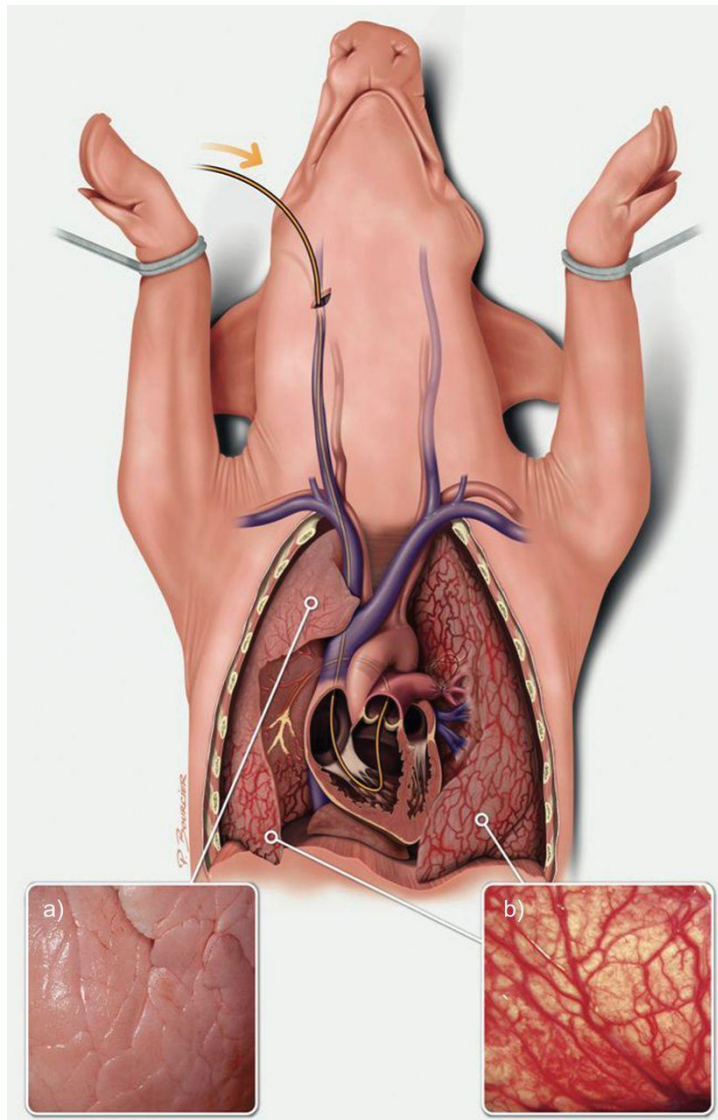
La deuxième difficulté était la grande réserve de la circulation pulmonaire, qui nécessitait une obstruction de plus de la moitié du lit vasculaire pulmonaire afin d'obtenir une augmentation des RVP.

Les capacités d'adaptation du système vasculaire pulmonaire expliquent pourquoi les injections répétées de petits matériaux inertes et non absorbables n'ont pu reproduire l'HPPE.

Un nouveau modèle porcin d'HPPE reproduit de manière assez proche la maladie chez le patient. Il permet d'obtenir et de comparer des animaux avec un ventricule droit défaillant avec des animaux ayant un ventricule droit adapté. Ce modèle porcin d'HPPE a été mis au point par notre équipe au sein du laboratoire (Mercier et Fadel, 2013). Un remodelage de la structure et de la fonction du ventricule droit est observé au bout de 5 semaines (Figure 21). Il s'agit de réaliser, sous anesthésie générale, une ligature de l'AP gauche en semaine 1 (thoracotomie postéro latérale gauche dans le 5e espace intercostal, suivie d'une dissection minutieuse du hile

pulmonaire permettant d'accéder à l'AP gauche qui est ligaturée (lac en tissu non résorbable). Après réalisation d'une hémostase de la cavité pleurale, l'espace inter costal, le muscle dentelé, le grand dorsal et le plan cutané sont refermés plan par plan à l'aide de fil tressé à résorption lente. Des embolisations progressives itératives hebdomadaires de l'artère lobaire inférieure droite seront réalisées, sous anesthésie générale, des semaines 2 à 6, afin d'augmenter progressivement la post charge du ventricule droit jusqu'à obtention de la sévérité souhaitée. Il s'agit d'une injection d'Histoacryl (monomère de n-butyl-2-cyanoacrylate qui polymérise en présence de liquide biologique) afin d'occlure progressivement la lumière vasculaire de l'artère choisie et d'obtenir une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos. L'Histoacryl se solidifie immédiatement après le contact avec le sang et adhère à la paroi artérielle. Au bout de 5 semaines, ce modèle porcin reproduit toutes les fonctionnalités de l'HPPE humaine: augmentation la résistance vasculaire pulmonaire, augmentation la pression artérielle pulmonaire moyenne, augmentation de l'épaisseur de la média des artères pulmonaires distales dans les territoires obstrués et non-obstrués, augmentation de l'apport de sang systémique à travers les artères bronchiques dans les territoires obstrués, hypertrophie du ventricule droit. Dans ce modèle, bien que les embolisations aient été arrêtés au bout de 5 semaines, l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire persiste jusqu'à 1 mois après la dernière embolisation. Toutefois, il faut garder à l'esprit que dans ce modèle, les matériaux d'obstruction ne reflètent pas la complexité du séquestre dans l'HPPE humaine, ce qui rend difficile de comparer les mécanismes cellulaires et moléculaires dans l'HPPE expérimentale à celle de l'Homme.





**Figure 21 : Modèle porcin d'HPPE montrant l'obstruction de l'artère pulmonaire consistant en la ligature de l'artère pulmonaire gauche suivi de processus d'embolisations répétées dans le lobe inférieur droit (Mercier et Fadel, 2013).**

(a) lobe supérieur droit apparemment normal. (b) Hypertrophie de l'artère bronchique sur le territoire du poumon ischémique.

| Modèles animaux  | Espèces                   | Avantages   | Inconvénients   |
|--|---------------------------|---|---|
| <b>Ligature VCI ou modèles de sténoses (0-28j)</b>                                   | Rongeurs, porcs, primates | Reproduire résolution et organisation du séquestre  | Etudes sur veines (pas AP)<br>Pas d'HP<br>Pas de vasculopathies additionnelles<br><br>Pas de pathogénèse            |
| <b>Modèle de ligature de l'AP (5 semaines)</b>                                       | Rongeurs, porcs           | Reproduire les territoires obstrués avec des vasculopathies post-obstructive (circulation bronchiale, vasculopathie pulmonaire distale) | Pas d'HP<br>Pas de vasculopathie distale dans les poumons non obstrués<br>Pas de remodelage du VD et de dysfonction |
| <b>Modèle d'hyper-débit pulmonaire (shunt aorto-pulmonaire, 5 semaines overflow)</b> | Porcs                     | Reproduire les territoires non obstrués avec des vasculopathies pulmonaires distales avec augmentation de l'épaisseur de la média       | Pas de pathogénèse<br>Pas de vasculopathies post-obstructive<br>Pas d'obstruction pulmonaire                        |
| <b>Ligature AP + embolisation (5 semaines)</b>                                       | Porcs                     | Reproduire les territoires obstrués et non obstrués<br>Reproduire le remodelage du VD et sa dysfonction<br>Reproduire l'HP élevée       | Pas de pathogénèse  |

VCI: Veine cave inférieure; AP: Artère pulmonaire; HP: Hypertension Pulmonaire; VD: ventricule droit

**Tableau 1 : Récapitulatif des différents modèles animaux dans la résolution et l'organisation du séquestre (Mercier et Fadel, 2013)**

|   | Année | Animaux                    | Modèles  | Hypothèses   | Conclusions  |
|---|-------|----------------------------|--|--|--|
| <b>Modèle animal de thromboses veineuses</b>  |       |                            |  |  |  |
| MILLET  | 1996  | Rat                        | Modèle de stase de Wessler (injection de sérum + ligature temporaire de VCI)   | Comparaison d'injections homologues vs hétérologues de sérum pour obtenir des modèles de thrombus  | Le sérum homologue induit le même thrombus que le sérum hétérologue  |
| FOWLKES                                       | 1998  | Rat et primates            | Thrombose de VCI par ligature ou ballon d'occlusion  | L'échogénicité des ultrasons sur le thrombus peut prédire l'âge des caillots dans deux espèces animales différentes                      | L'échogénicité du thrombus peut prédire l'âge du thrombus chez le rat et le babouin et est corrélé à la concentration de la fibrine présente dans le thrombus                                      |
| KANG  | 2003  | Cochon                     | Dé-endothélialisation avec 50% ou 80% de sténose de la veine jugulaire, remplacement d'un segment veineux par prothèse vasculaire Gore-Tex,± infusion de thromboplastine | Description de six nouveaux modèles animaux de thrombose veineuse reproduisant la pathologie chez l'Homme                                | -  |
| XIE   | 2004  | Rat                        | Thrombose de VCI par ligature  | L'élasticité des thrombus via des ultrasons peut prédire l'âge des caillots  | La résolution spontanée du thrombus de la VCI induit un durcissement progressif avec l'âge qui peut être déterminé par ultrasons   |
| <b>Inflammation et résolution du thrombus</b> |       |                            |  |  |  |
| WAKEFIELD                                     | 1995  | Rat                        | Thrombose de VCI par ligature  | Inflammation de la paroi veineuse pendant la thrombose<br>Extravasation de neutrophiles et de monocytes/macrophages : rôle des cytokines | Le nombre de neutrophiles attractants (ENA-78, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 et monocytes/macrophages attractants (MIP-1 $\alpha$ , ICAM-1, TNF- $\alpha$ ) augmente durant la formation du thrombus |
| WAKEFIELD                                     | 1999  | Rat                        | Thrombose de VCI par ligature  | Rôle de l'IL-8 dans la néovascularisation des thrombus   | L'IL-8 augmente la néovascularisation dans le thrombus   |
| LONDY   | 1999  | Rat                        | Thrombose de VCI par ligature  | Rôle de l'IL-10 dans la réduction de l'inflammation péri-veineuse  | L'IRM peut quantifier l'inflammation péri-veineuse modifiée par le traitement à l'IL-10  |
| HENKE   | 2004  | Souris et souris CXCR2 -/- | Thrombose de VCI par ligature  | Inflammation et résolution du thrombus : rôle des neutrophiles et de leur récepteur CXCR2  | La résolution du thrombus implique la voie CXCR2   |
| VARMA   | 2003  | Rat                        | Thrombose de VCI par ligature  | Rôle des neutrophiles dans la résolution des thrombus  | La neutropénie altère l'activité fibrinolytique qui elle ralentit la résolution du thrombus mais augmente la quantité de collagène dans le thrombus  |

|  |      |  |  |   |   |
|--|------|--|--|---|---|
| HENKE  | 2001 | Rat                                      | Thrombose de VCI par ligature  | Rôle de l'IL-8 (cytokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques) dans la résolution du thrombus | L'IL-8 augmente la résolution du thrombus et la fibrose grâce à une néovascularisation du thrombus et une augmentation du nombre de neutrophiles    |
| SINGH  | 2003 | Souris, souris tPA -/- et souris uPA -/- | Thrombose de VCI par ligature et dommage endothélial                       | Rôle des uPA et tPA dans la résolution des thrombus   | Le plasminogène induit un recrutement des monocytes au sein du thrombus et augmente sa résolution   |
| HUMPHRIES  | 1999 | Rat                                      | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Rôle du MCP-1 dans la résolution des thrombus   | L'injection de MCP-1 dans le thrombus favorise son organisation et sa résolution  |
| McGUINNESS   | 2001 | Rat                                      | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Rôle des monocytes dans la résolution des thrombus  | Les monocytes migrent dans le thrombus pendant sa résolution  |
| BONDERMAN  | 2008 | Souris                                   | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe ± injection <i>S.aureus</i> | Rôle de l'infection de <i>S.Aureus</i> dans la résolution malencontreuse des thrombus             | L'infection à <i>S.Aureus</i> du thrombus augmente le remodelage vasculaire fibrotique  |
| <b>Angiogenèse, résolution et organisation du thrombus</b> |      |  |  |   |   |
| WALTHAM  | 2000 | Rat                                      | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Rôle du VEGF et bFGF dans la résolution des thrombus  | VEGF et bFGF sont exprimés temporairement durant l'organisation et la résolution du thrombus  |
| WALTHAM  | 2003 | Rat                                      | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Rôle du VEGF dans la résolution des thrombus  | L'injection de VEGF dans le thrombus augmente sa résolution et son organisation   |
| WALTHAM  | 2005 | Rat                                      | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Effet de la transfection du gène VEGF dans la résolution des thrombus                             | La transfection de plasmide contenant le gène humain du VEGF au sein du thrombus, augmente sa résolution et sa recanalisation                       |
| MODARAI  | 2008 | Rat et souris                            | Thrombose de VCI par 80-90% de sténose externe                             | Effet de la thérapie génique (VEGF) dans la résolution des thrombus                               | Injection d'un adénovirus contenant le gène du VEGF augmente la résolution et la recanalisation du thrombus ainsi que le recrutement de macrophages |

VCI: veine cave inférieure; ENA: Extractable Nuclear ; TNF- $\alpha$  : Tumeur Necrosis factor  $\alpha$  ; IL: interleukine; MCP: Monocyte-Chemoattractant Protein; MIP: Macrophage Inflammatory protein; ICAM: intercellular adhesion molecular; IRM: Imagerie à résonance magnétique; tPA: tissue plasminogen activator; uPA: urokinase plasminogen activator; VEGF: vascular endothelial growth factor; bFGF: basic fibroblast growth factor; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*

**Tableau 2 : Modèles animaux actuels utilisés pour étudier la pathogenèse et la pathobiologie de l'HPPE (Mercier et Fadel, 2013)**

# OBJECTIFS

# Hypothèses et Objectifs de thèse

---

L'HPPE est une pathologie rare et mortelle du fait d'une aggravation inéluctable de la symptomatologie. Cette pathologie est liée à la persistance et l'organisation fibreuse de caillots au sein du lit vasculaire pulmonaire après une ou plusieurs épisodes d'embolies pulmonaires aiguës. La conséquence de l'obstruction artérielle pulmonaire est une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires aboutissant à une insuffisance cardiaque droite.

Notre hypothèse est que le remaniement hypertrophique observé dans l'HPPE pourrait résulter d'une dysfonction et/ou souffrance des cellules endothéliales, elles-mêmes en contact avec le séquestre, et constituant le site d'initiation du remaniement vasculaire pulmonaire.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction endothéliale chez des patients souffrant d'HPPE.

Pour tester cette hypothèse, plusieurs objectifs ont été proposés au cours de ce travail de thèse :

1. Etudier le phénotype de la cellule endothéliale en contact avec le séquestre chez les patients atteints d'HPPE et les comparer aux cellules issues d'AP de contrôle afin de mettre en évidence les différentes altérations et d'en déterminer les mécanismes moléculaires. De même, évaluer les propriétés intrinsèques de la cellule endothéliale isolée à partir de séquestres de patients ayant une HTAP post-embolique (produit d'endartériectomie): l'expression des molécules d'adhésion, ainsi que la capacité de ces cellules de synthétiser des facteurs à activité paracrine comme des facteurs de croissance (PDGF, EGF, FGF-2) et des cytokines (MCP-1, IL-6, IL-8). Aussi, évaluer les propriétés de monocytes et des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires dans l'HPPE.

2. Etudier l'expression et le rôle de la protéine ICAM-1 dans le phénotype anormal de la cellule endothéliale d'HPPE. Ainsi qu'évaluer les conséquences de la modulation de son expression et/ou son activité sur l'altération de la fonction de la cellule endothéliale. Notre hypothèse est qu'ICAM-1 pourrait contrôler la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules endothéliales dans le séquestre de patients ayant une HPPE, à travers une boucle

autocrine.

3. Etudier la néo-angiogénèse dans les séquestres de patients souffrant d'HPPE, cette étude inclue (i) la quantification de cette néo-angiogénèse dans les séquestres de patients ; (ii) corréler la densité vasculaire à la sévérité de la maladie ; (iii) rechercher l'origine de cette néo-angiogénèse et le rôle du recrutement des cellules souches CD34+ dans ce processus ; (iv) dosage des marqueurs angiogéniques de recrutement des CD34+ (VEGF, FGF-2, ANG-1 et 2 et leurs récepteurs respectifs).

# **MATERIEL & METHODES**



# Matériel et méthodes

---

Ce chapitre relatara des différentes techniques utilisées dans les projets présentés. Les techniques spécifiques utilisées dans chaque projet sont décrites dans les matériels et méthodes des articles.

## I. Données cliniques des patients et prélèvements réalisés

### 1. Patients

L'étude est réalisée sur une population recrutée de façon prospective composée de patients opérés à l'Hôpital Marie Lannelongue d'une endartériectomie pulmonaire (patients HPPE) ou d'une exérèse pulmonaire (patients contrôles).

Un examen clinique est réalisé chez tous les sujets. Les données pertinentes telles que l'âge, le sexe, les antécédents cancérologiques, les antécédents thrombo-emboliques, facteurs de risque de maladie thrombo-embolique, la prise d'un traitement spécifique de l'HTAP (Sildenafil, Bosentan, ...) sont recueillies.

L'HTP est définie sur les données du cathétérisme cardiaque droit datant de moins d'un an. L'HTP est définie par une valeur de la PAPm supérieure à 25 mmHg au repos sans augmentation de la pression auriculaire gauche donc sans cardiopathie gauche.

La nature post-embolique de l'HTP est affirmée sur la scintigraphie de perfusion avec présence de déficits perfusionnels sans déficits ventilatoires associés.

L'angiographie pulmonaire permet de mettre en évidence et d'évaluer l'obstruction vasculaire pulmonaire par l'organisation fibreuse des anciens caillots. On peut voir des obstructions ou des sténoses.

L'angioscanner pulmonaire permettra de confirmer les lésions vues à l'angiographie mais permet aussi d'évaluer l'épaississement de la paroi artérielle et de faire le diagnostic différentiel avec d'autres causes d'HTP obstructive (sarcome de l'artère pulmonaire, obstruction tumorale ...).

Les sujets contrôles sont les patients opérés d'une résection pulmonaire à l'Hôpital Marie Lannelongue mais ne présentant pas d'hypertension pulmonaire, c'est-à-dire sans anomalie à l'échographie cardiaque (réalisée dans le cadre du soin) et appariés en âge et en sexe.

Les études réalisées sur ces prélèvements ont été approuvées par le Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France). Un consentement libre et éclairé a été recueilli pour tous les patients inclus dans ces études avant chaque prélèvement ou pour utilisées leurs données cliniques.

## 2. Prélèvements

Après endartériectomie pulmonaire chez les patients porteurs d'une HPPE, une partie du séquestre est utilisée pour la culture de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses, et une autre partie conservée pour une analyse tissulaire globale. Ces séquestres d'endartériectomie sont recueillis en peropératoire et conservés à 4°C dans du milieu "DMEM" jusqu'à leur utilisation.

Pour les patients témoins, un fragment d'artère pulmonaire est prélevé à distance d'une tumeur bénigne ou maligne sur la pièce d'exérèse pulmonaire. Le prélèvement pulmonaire suit les mêmes phases de préparation que le séquestre d'endartériectomie.

De même, des prélèvements sanguins sont réalisés chez les patients opérés à l'Hôpital Marie Lannelongue d'une endartériectomie pulmonaire ou d'une exérèse pulmonaire (patients contrôles). Ils sont stockés dans un congélateur à -20°C. Les prélèvements sont réalisés la veille de l'intervention.

## II. Colorations

Les séquestres de patients souffrant d'HPPE sont d'abord fixés au formol et inclus en blocs de paraffine. Ensuite, des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur sont réalisées et montées sur des lames. Afin d'identifier les composants du séquestre, plusieurs coloration sont réalisées : l'hématoxyline-éosine safran permet d'identifier la composition cellulaire, puis le trichrome de Masson, un indicateur des dépôts de matrice extracellulaire.

### III. Culture cellulaire

#### 1. Isolement des cellules endothéliales

L'isolement des CE pulmonaires se fait en deux étapes principales : une dissociation tissulaire par une digestion enzymatique puis une sélection spécifique par un anticorps monoclonal anti-CD31 humain couplé à des billes ferromagnétiques.

Les morceaux d'artères pulmonaires issus de patients opérés pour lobectomies (témoins) ou les séquestres des patients HPPE sont lavés et découpés en morceaux, puis soumis à une digestion enzymatique pendant 2h à 37°C sous agitation. La suspension cellulaire est filtrée et lavée puis déposée dans des plaques 6 puits recouvertes de 0,1% de gélatine dans du milieu de culture contenant du milieu MCDB 131, 2 mM L-Glutamine, Pénicilline/Streptomycine (100 U/mL Pénicilline et 0.1 mg/mL Streptomycine), 0,05 mg/mL Fungizone, 20 mM HEPES, 5000 UI/mL Héparine, 10% sérum de veau fœtal, 10 ng/mL VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et 1 µg/mL ECGS (facteur de croissance : Endothelial Cell Growth Supplement). Elles sont maintenues à 37°C dans une étuve saturée en humidité contenant 5% de CO<sub>2</sub>. A 70-80% de confluence, les cellules endothéliales sont isolées par tri magnétique. Les billes sont couplées avec l'anticorps anti-PECAM-1 (CD31) (Dynabeads CD31) qui est un marqueur spécifique des CE. Les cellules sont trypsinées puis mises en contact avec les billes. La suspension cellulaire est incubée pendant 20 min à 4°C sous rotation. A l'aide d'un aimant, les CE fixées aux billes PECAM-1 seront éluées et placées à nouveau dans une boîte de culture.

Afin d'évaluer la pureté des cultures primaires, les cellules sont caractérisées par immunomarquage. Les cultures de CE utilisées dans nos expériences sont des cellules positives pour l'immunomarquage avec le CD31 et négatives pour la vimentine et la desmine (Figure 22). Les cellules sont utilisées pour l'étude entre les passages 3 et 6. Les traitements testés sont expliqués et détaillés dans chaque étude.

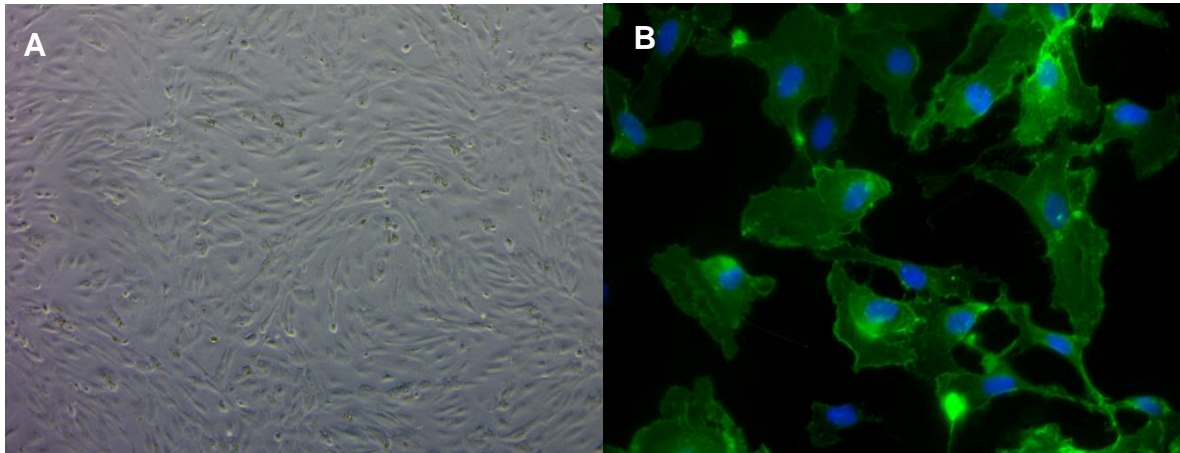


Figure 22 : A. Images de cellules endothéliales HPPE en culture. B Immunomarquage de cellules endothéliales (en bleu : DAPI, en vert : CD31)

## 2. Isolement des cellules musculaires lisses

Les CML-AP sont isolées selon la technique d'explants mise au point par le laboratoire (Eddahibi et al, 2001). Les artères pulmonaires provenant de contrôles et les séquestres de patients HPPE sont placées dans du milieu DMEM lors du prélèvement chirurgical et stockées à 4°C. Ensuite, la couche adventitielle résiduelle est éliminée. La zone médiale est découpée en petits morceaux de 2 à 5 mm<sup>2</sup>, et placés dans des plaques 6 puits en présence d'un milieu complet composé de milieu DMEM 4,5 g glucose/l, 15% de sérum de veau foetal 15%, 2 mM L-glutamine, 20 mM HEPES, 10 ng/mL EGF, 1X Insuline/Transferrine, des antibiotiques (100 U/mL Pénicilline et 0.1 mg/mL Streptomycine) et un anti-fongique (0,05 mg/mL fungizone). Les cellules prolifèrent et occupent toute la surface de la boîte après environ deux semaines d'incubation. Ensuite, elles sont trypsinées et amplifiées dans de nouvelles boîtes de culture de plus grande surface (constituant ainsi le premier passage). Les CML-AP sont utilisées entre les passages 3 et 6. Pour caractériser les cultures primaires des CML obtenues, les cellules de chaque culture sont soumises à un marquage immunofluorescent (Figure 23). Seules les cultures de CML exprimant les protéines du cytosquelette : Smooth Muscle-actine (SMA) sont utilisées dans nos expériences.

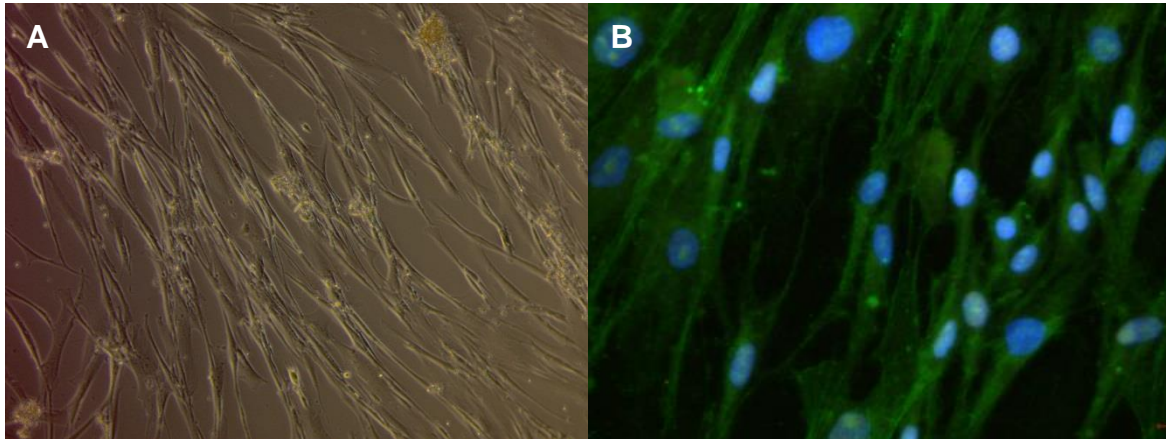


Figure 23 : A. Images de cellules musculaires lisses HPPE en culture. B Immunomarquage de cellules musculaires lisses (en bleu : DAPI, en vert :  $\alpha$ -actine)

### 3. Isolement de monocytes

Les prélèvements sanguins proviennent de contrôles opérés pour une exérèse pulmonaire (lobectomie, pneumonectomie) et de patients souffrant d'HPPE à l'Hôpital Marie Lannelongue (HML, Le Plessis Robinson, France). Après consentement éclairé du patient, quatre tubes EDTA de 5 mL sont prélevés pour chaque patient. L'isolement des monocytes est réalisé par gradient de Ficoll. On dépose du sang dilué sur une couche de Ficoll-Hypaque (densité de 1,077 g/l). Après centrifugation 30 min à 3000 g, les cellules de faible densité, lymphocytes et monocytes, occupent la phase supérieure au-dessus du Ficoll alors que toutes les autres composantes du sang sont dans la phase inférieure. Des tubes de plasma sont également préparés à partir du sang total par simple centrifugation.

## IV. Etude de l'expression génique

Toutes les réactions PCR en temps réel sont réalisées sur des plaques de 96 puits dans l'appareil Step one plus® (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Les PCR en temps réel ont été réalisés sur les gènes d'intérêt suivant : ICAM-1, FGF-2, FGF-R1, FGF-R2, ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1 et VEGF-R2.

## 1. Extraction des ARN et Reverse Transcription

L'extraction des ARN totaux est réalisée sur des cellules endothéliales à 60-80% de confluence. Les ARN totaux sont extraits en utilisant la méthode de phénol-chloroforme. Les cellules sont lavées puis sont incubées dans une solution de Trizol, puis avec une solution de chloroforme et enfin centrifugée. Ensuite, une précipitation des acides nucléiques est réalisée avec de l'isopropanol. Après centrifugation, les culots correspondants aux ARN totaux sont dilués dans de l'eau puis dosés. L'intégrité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose. La présence de 2 bandes nettes et distinctes après révélation sous ultraviolets (UV) reflète la qualité des ARN ribosomiaux majoritaires (18S et 28S) et donc, par extrapolation, reflète la qualité des ARN totaux. Les échantillons dont les ARN ne répondent pas à ces conditions sont exclus de toute analyse.

Les ARN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm sur le Nanodrop™ 1000 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA). Le dosage permet également de faire une sélection des ARN. En effet, la contamination protéique est estimée par une lecture à 280 nm : le rapport  $DO_{260}/DO_{280}$  doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie la présence de contaminants protéiques. S'il est supérieur à 2, il existe une contamination par un composant du réactif. Une autre condition est requise pour l'utilisation des ARN : leur concentration. Seules les concentrations supérieures à 85 ng / $\mu$ L sont retenues.

La réaction de transcription inverse des ARNm en ADNc est réalisée grâce au kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, les Ulis, France). Brièvement, l'ADN génomique présent dans les extraits d'ARN totaux est éliminé en ajoutant 1X de tampon de gDNA « Wipeout »7X (DNase). Le mélange est incubé pendant 2 min à 42°C. Les échantillons sont ensuite mis en présence de Quantiscript® Reverse Transcriptase 1X, de tampon Quantiscript® RT Buffer 5X puis de «RT primer mix» 1X (Qiagen, France). Les échantillons sont incubés dans le thermocycleur pendant 15 min à 42°C (hybridation des amorces sur l'ARN et élongation du brin d'ADNc) puis 3 min à 95°C (dénaturation de l'enzyme). Les ADNc synthétisés sont stockés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

## 2. PCR et quantification

La PCR est réalisée avec 10 ng d'ADNc et en duplicate pour chaque échantillon. L'expression des gènes étudiés est évaluée selon la méthode relative du  $\Delta\Delta Ct$ . Un gène constitutivement exprimé (18S rRNA) est sélectionné comme contrôle interne de la quantité réelle d'ADNc utilisé dans chaque réaction de PCR. Le nombre de cycles obtenus pour le gène étudié est normalisé par rapport à celle du gène de référence (18S rRNA) et correspond à  $\Delta Ct$  ( $Ct$  du gène étudié -  $Ct$  du gène de 18S rRNA). La différence d'expression de chaque échantillon est donnée par la différence  $\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta Ct$  de l'échantillon -  $\Delta Ct$  de l'échantillon témoin). Enfin, la quantité relative de chaque échantillon est donnée par l'équation  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Les résultats obtenus sont exprimés en unités arbitraires (UA). La PCR est réalisée avec 10 ng d'ADNc.

## V. Localisation et quantification protéique

### 1. Marquages immunohistochimiques (IHC) sur séquestres d'AP

Des marquages IHC sur des coupes paraffines de séquestres issus d'endartériectomie pulmonaire sont réalisés pour mettre en évidence les protéines suivantes ICAM-1, CD11a, CD18, CD31, CD34,  $\alpha$  actine ou anti-CD68.

Des coupes de 5  $\mu m$  d'épaisseur de biopsies de séquestres préalablement fixées au formol incluses en paraffine sont utilisées. Une étape de déparaffinage des lames est effectuée dans du toluène puis une réhydratation dans des bains croissants d'éthanol. Un prétraitement au citrate à pH6 est réalisé afin de démasquer les épitopes antigéniques. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les lames sont incubées dans une solution de PBS additionnée de 10% d'Ig. Les lames sont incubées avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines suivantes : ICAM-1, CD11a, CD18, CD31, CD34,  $\alpha$ -actine ou CD68. Ensuite, les anticorps secondaires couplés à des fluorophores (Alexa Fluor 594 ou 488, Molecular Probes, Invitrogen) sont utilisés respectivement contre les anticorps primaires. Pour colorer les noyaux des cellules, un marquage au DAPI est réalisé. Les marquages fluorescents ainsi obtenus sont analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i, Japon).

## 2. Marquages immunofluorescents sur cellules endothéliales

Afin de localiser les protéines d'intérêts, des marquages immunofluorescents sont réalisés sur des CE traitées ou non. Les CE sontensemencées à la même densité sur boîtes de Pétri 60 cm<sup>2</sup> contenant des lamelles en verre et recouvert de 0,1% de gélatine. Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les cellules sont incubées dans une solution de PBS additionnée de 10% d'Immunoglobuline pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont mises en contact avec les anticorps primaires (ICAM-1, Src, p38, pErk1/2, Survivine et CD31) à 4°C pendant toute la nuit. Des marquages sont réalisés avec des IgG contrôles à la place des anticorps primaires d'intérêt afin de valider la spécificité du marquage obtenu (contrôle négatif). Ensuite, les anticorps secondaires couplés à des fluorophores (Alexa Fluor 594 ou 488, Molecular Probes, Invitrogen) sont utilisées respectivement contre les anticorps primaires. Pour colorer les noyaux des cellules, un marquage au DAPI est réalisé. Les marquages fluorescents ainsi obtenus sont analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i, Japon).

## 3. ELISA

Le test ELISA est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Dans le but d'évaluer l'expression des protéines circulantes dans les surnageants cellulaires, au niveau plasmatique et au niveau de broyats tissulaires, nous avons utilisé des kits ELISA. Les surnageants de culture ont été obtenus à partir des cultures cellulaires de CEensemencées à 200 000 cellules/10 cm<sup>2</sup> avec 1 mL de milieu adapté pendant 24h. Une partie du séquestre des patients souffrant d'HPPE est conservé et congelé à -80°C. 100 mg de séquestre sera broyé, lysé et homogénéisé dans du tampon de lyse protéique adapté. La concentration protéique totale du broyat tissulaire obtenu sera déterminée par la méthode de Bradford. Au cours de ce travail, les dosages ELISA visant à quantifier les taux des protéines sont les suivants : MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, PDGF, EGF, VCAM-1, ICAM-1, FGF-2, ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R1 et VEGF-R2.



## 4. Western blots

La technique du Western blot est utilisée afin d'évaluer l'expression des protéines d'intérêt.

Les Western blots sont réalisés sur des lysats de CE traitées ou non et/ou de monocytes.

Les culots cellulaires sont lysés et homogénéisés dans un tampon contenant des anti-protéases et des anti-phosphatases (Igepal (CA-630) 1%, Glycérol 10%, Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, aprotinine 10 µg/mL, leupeptine 10 µg/mL, pepstatine 10 µg/mL, complété d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases). La concentration protéique est déterminée grâce à la méthode Bradford.

Les protéines sont d'abord dénaturées. Puis, 20 µg d'extraits protéiques totaux sont séparés sur des gels de polyacrylamide (NuPAGE Bis Tris Novex, Invitrogen). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en PVDF ou en nitrocellulose (Hybond, GE Healthcare). Afin de bloquer les sites aspécifiques, une étape de saturation est réalisée par incubation de la membrane en présence d'une solution de TBST 0,1% (10 mM Tris pH 8 ; 150 mM NaCl ; 0,1 % Tween-20) contenant 5% de lait pendant 1h à température ambiante. La révélation des protéines d'intérêt est réalisée en incubant les membranes en présence des anticorps primaires spécifiques à 4°C sur la nuit. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : ICAM-1, CD11a et CD18, 1/500<sup>ème</sup>, Santa Cruz Biotechnology ; SrC, phospho-SrC (Y416), p38, phospho-p38<sup>MAPK</sup>, pErk1/2, Phospho-pERK1/2, Survivine, 1/1000<sup>ème</sup>, Cell Signaling et la β-actine, 1/5000<sup>ème</sup> Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France. Ensuite, on procède à une incubation des membranes en présence des anticorps secondaires adéquats couplés à l'enzyme HRP (*Horseradish peroxidase*) pendant 1h. Après lavage, les membranes sont révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL (Perkin Elmer, Roche). Celle-ci sera révélée par l'appareil Chemidoc® (Biorad). Les signaux obtenus sont analysés par le logiciel Image Lab 3.0 (Biorad). L'expression des différentes protéines utilisées est rapportée à celle de la β-actine. Les résultats sont exprimés par le rapport des intensités des protéines/ β-actine.

## VI. Etude des fonctions cellulaires

### 1. Evaluation de la Prolifération cellulaire

#### 1.1 Par incorporation de BrdU

Cette technique permet d'évaluer la prolifération cellulaire qui est directement corrélée à l'incorporation de Bromodeoxyurédine (BrdU), analogue de la thymine au niveau de l'ADN néo-synthétisé, et quantifiée avec un anticorps anti-BrdU. Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de  $5 \times 10^4$  cellules par puits pendant 24 heures dans du milieu complet. Les cellules sont ensuite synchronisées par simple privation de sérum pendant 48 heures afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire. Les cellules ont ensuite été traitées selon différentes conditions (agents et concentrations) dans du milieu contenant du BrdU pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées puis immunomarquées à l'aide d'un anticorps anti-BrdU couplé à un fluorochrome Europium. L'intensité de la fluorescence est mesurée grâce à l'appareil Envision (Perkin Elmer). Toutes les conditions ont été évaluées en triplicate.

#### 1.2 Par Comptage Cellulaire

Dans cette partie, on procède de la même manière que dans la méthode de la prolifération par incorporation de BrdU. Après cette période, les cellules sont trypsinées puis comptées à l'aide de lames de Malassez.

### 2. Apoptose

L'apoptose est évaluée par la technique TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) qui consiste à mesurer la fragmentation de l'ADN et par conséquent les cellules en apoptose. Pour cela, les CE sontensemencées à la même densité puis fixées au paraformaldéhyde 4% sur des lamelles. Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X-100, puis incubées pendant une heure à 37°C avec un mélange réactionnel TUNEL en suivant les recommandations du fournisseur du DeadEnd TUNEL System (Promega). Celui-ci permet à l'enzyme recombinante TDT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) d'incorporer des dUTP couplés à la fluorescéine à l'extrémité 3'-OH des brins d'ADN. Les noyaux sont contre-colorés au DAPI puis les cellules sont analysées à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i,

Japon). La quantification des cellules positives au marquage TUNEL (dont le noyau apparaissait en rouge) est effectuée à partir de quatre images par lamelles.

### 3. Migration cellulaire

Pour cette technique, des chambres de Boyden sont utilisées afin d'étudier la migration cellulaire en réponse à un facteur chimiotactique. Une chambre de Boyden est composée de deux compartiments séparés par un insert constitué d'une membrane poreuse. Ainsi pendant la migration cellulaire, les cellules placées dans le compartiment du haut migrent vers le compartiment du bas à travers cette membrane poreuse. Puis, ces cellules sont colorées et comptées.

### 4. Angiogenèse *in vitro*

L'angiogenèse est caractérisée par un certain nombre d'événements cellulaires, incluant la migration des cellules endothéliales, la prolifération et la différenciation en capillaires. Les tests *in vitro* de formation de microtubes endothéliaux sont utilisés comme modèle pour étudier l'angiogenèse et la modulation de la formation du tube endothélial par des agents pro ou anti-angiogéniques.

Pour cela, les CE sontensemencées à la même densité ( $3 \times 10^5$  cellules/puits) dans des plaques 24 puits contenant du Matrigel (Corning), puis les cellules sont traitées ou non pendant 24 heures. Ensuite, les cellules sont incubées avec un fluorophore (Calcéine AM) pendant 30 à 40 min. L'acquisition des images et la quantification des cellules marquées par fluorescence sont réalisées au microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i).

## VII. Etude du polymorphisme du gène ICAM-1

L'ADN génomique total est extrait à partir de sang total (119 patients contrôles) et de séquestres (179 patients ayant une HPPE). L'ADN est extrait selon la méthode de phénol chloroforme. Brièvement, les cellules du sang et les morceaux de tissus sont lysées grâce à une solution contenant de la protéinase K (20 mg/mL) et 10% de SDS pendant 2-3 heures. Après centrifugation, le surnageant est mis en présence d'une solution de chloroforme. La phase transparente est récupérée (ADN génomique), puis mise en présence d'éthanol absolu puis

centrifugée. Après 2 lavages avec de l'éthanol absolu, le culot d'ADN génomique est dilué dans de l'eau puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

La PCR est réalisée suivant le mélange réactionnel suivant : 100 ng d'ADN génomique, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> et 0.4 µM de chaque amorce spécifique d'ICAM-1 (5'-GGA-ACC-CAT-TGC-CCG-AGC-3' et l'amorce anti-sens est 5'-GGT-GAG-GAT-TGC-ATT-AGG-TC-3'). Ces éléments sont additionnés au milieu réactionnel pour PCR contenant le tampon de PCR, 1U of Taq polymérase et de l'eau purifiée selon les recommandations du fournisseur (kit M7401, Promega). L'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (Biorad) et selon les conditions suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 30 cycles à phase de dénaturation à 95°C pendant 30 s, phase d'hybridation à 61°C pendant 30 s et une phase d'élongation d'amorce à 72°C pendant 60 s, et une étape d'extension finale à 72°C pendant 5 min. Puis, le produit de PCR de 223 pb est digéré par une enzyme de restriction BstU1 (Bsh1236I) à 37°C pendant une nuit. Après digestion, les produits de PCR sont identifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2,5%. Seul l'allèle E possède un seul site de clivage à BstU1 et produit des fragments de 136 pb et 87 pb, alors que l'allèle K n'a pas de site de clivage et produit seulement un seul fragment de 223 pb.

## VIII. Analyses statistiques

Le t test (Student) est utilisé pour comparer les différences quantitatives entre deux groupes. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel Prism 5.0 TM (GraphPad, San Diego, USA) et les données sont exprimées en moyenne ± SEM. Les données qui suivent une distribution gaussienne sont analysées par des tests paramétriques comme l'analyse de variance ANOVA (multiples comparaisons de moyennes). Les données qui ne suivent pas une distribution gaussienne sont analysées par des tests non paramétriques : test Kruskal-Wallis (pour comparer au moins trois groupes) et test Mann-Whitney (pour comparer deux groupes) quand les valeurs sont non appariées.

Une probabilité de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

# RESULTATS

# Résultats

---

## **Etude 1: « *Abnormal Pulmonary Endothelial Cells May Underlie The Enigmatic Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension* »**

Accepté dans *Journal of Heart and Lung Transplantation*

### ***Introduction***

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE) est une maladie rare résultant d'une obstruction mécanique progressive des artères pulmonaires. Cette pathologie a un traitement chirurgical, l'endartériectomie pulmonaire. Bien que cette maladie ait un traitement, les mécanismes qui impliquent la formation et la persistance d'un séquestre conduisant à un remodelage vasculaire fibreux, restent à ce jour inconnu.

### ***Hypothèse***

L'endothélium pulmonaire étant directement en contact avec le séquestre, pourrait être impliqué dans ces altérations. En effet le rôle de l'endothélium et sa dysfonction endothéliale a été largement étudié dans l'HTAPi. Etant donné leur interaction avec le séquestre et les résultats observés dans d'autre type d'hypertension pulmonaire, nous avons supposé que la cellule endothéliale pulmonaire pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de l'HPPE.

### ***Résultats et discussion***

Dans cette étude, nous avons utilisé des CE extraites et mises en culture à partir de produits d'endartériectomie pulmonaire pour étudier la fonction paracrine de la CE et son influence sur les CML et les monocytes au niveau de l'artère pulmonaire.

Dans un premier temps, par coloration, nous avons pu évaluer l'aspect macroscopique et microscopique de séquestres obtenus à partir de patients ayant une HPPE. Le ratio moyen observé est de 74% de séquestre organisé (collagène) et 26% de zones de fibrine. La portion organisée du séquestre contient généralement des fibroblastes / myofibroblastes, des cellules inflammatoires (principalement les lymphocytes et les macrophages) et de nombreux néo-vaisseaux de taille variable, appelés vaisseaux de perméabilisation. Ensuite, nous avons dosé

dans le plasma de patients (94 contrôles et 109 patients souffrant d'HPPE) différents types de facteurs : facteurs de croissance, molécules d'adhésion et cytokines inflammatoires. Grâce à la technique ELISA, nous avons montré que les cytokines inflammatoires (MCP-1, IL-1 et IL-6) et les molécules d'adhésion (ICAM-1 et VCAM-1) sont plus élevées dans le plasma des patients souffrant d'HPPE. Par contre, on ne retrouve pas cette différence pour les facteurs de croissance (PDGF-BB, FGF-2, EGF et TGF- $\beta$ 1). Toutefois, nous n'avons observé aucune corrélation entre les taux de ces facteurs et la sévérité de la maladie. Nous avons également dosé ces différents facteurs dans le surnageant de CE provenant de 10 contrôles et 10 patients souffrant d'HPPE. Le surnageant de cellules endothéliales de patients ayant une HPPE présente une expression accrue en facteur de croissance, en molécule d'adhésion et en cytokines inflammatoires comparé au surnageant de CE contrôles. En effet, les taux de MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, ICAM-1 et FGF-2 sont plus élevés dans le surnageant des CE d'HPPE. Par contre, les dosages de VCAM-1, EGF, PDGF et TGF- $\beta$  n'ont montré aucune différence. Ensuite, nous avons voulu voir le rôle des CML dans la pathogénèse de l'HPPE. Dans une expérience *in vitro*, nous n'avons montré aucune différence dans la prolifération des CML contrôles ou d'HPPE. Toutefois, on a pu montrer une augmentation de la prolifération des CML contrôles ou d'HPPE lorsque celles-ci sont mises en contact avec du surnageant de cellules endothéliales d'HPPE. De la même manière, la migration des monocytes ne semble pas être altérée dans l'HPPE. Cependant, nous avons observé une augmentation de la migration des monocytes provenant de contrôles et de patients HPPE lorsque ceux-ci sont mis en présence avec le surnageant des CE provenant de patients HPPE. Ce phénomène semble être dû à la synthèse accrue du MCP-1 par les CE de ces patients car il est complètement inhibé par un inhibiteur de MCP.

### **Conclusion**

A travers ce travail, nous avons pu montrer que les CE provenant de patients ayant une HPPE expriment des taux accrus de cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion. Ces résultats suggèrent que la dysfonction de ces CE peut être le mécanisme sous-jacent de la formation et la persistance du séquestre responsable du remodelage vasculaire.

Manuscript Number: JHLT-D-16-00025R2

Title: Abnormal Pulmonary Endothelial Cells May Underlie The Enigmatic  
Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

Article Type: Original Clinical Science

Corresponding Author: Prof. Olaf Mercier, M.D., Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Hôpital Marie Lannelongue

First Author: Olaf Mercier, M.D., Ph.D.

Order of Authors: Olaf Mercier, M.D., Ph.D.; Jennifer Arthur Ataam, MSc;  
Nathaniel B Langer, MD, MSc; Peter Dorfmueller, MD, PhD; Lilia Lamrani;  
Florence Lecerf; Benoit Decante, MSc; Philippe G Dartevielle, MD; Saadia  
Eddahibi, PhD; Elie Fadel, MD, PhD



**Cover Letter**

Olaf Mercier, MD, PhD  
Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation  
Marie Lannelongue Hospital  
133 Avenue de la Resistance  
92350, Le Plessis Robinson, France

June 30, 2016

Mandeep R. Mehra, MBBS, FACC, FACP  
Editor, *Journal of Heart and Lung Transplantation*

Dear Editor,

Pleased find enclosed our revised manuscript entitled “**Abnormal Pulmonary Endothelial Cells May Underlie The Enigmatic Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension**” for consideration for publication in *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. We greatly appreciate the helpful comments provided by the reviewer and have taken them into account in this revision. We confirmed the endothelial characterization of the cells cultured from CTEPH patients. We hope that the revised manuscript will satisfy the editorial team. All the authors have approved the manuscript and meet the requirements for authorship. The manuscript has not been submitted for publication elsewhere.

Thank you very much for your consideration of our manuscript, and I look forward to your response.

Sincerely,  
Olaf Mercier, MD, PhD

**Abstract Word Count:** 210

**Text Word Count:** 3142

**Title:** Abnormal Pulmonary Endothelial Cells May Underlie The Enigmatic Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

**Running Head:** Pulmonary Endothelial Cells & CTEPH Pathogenesis

**Authors:** \*Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, \*Jennifer Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Nathaniel B. Langer, MD<sup>1,2</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>

**Academic Affiliations:**

<sup>1</sup> Research and Innovation Unit, INSERM U999, DHU TORINO, Paris Sud University, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>3</sup> Department of Pathology, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>4</sup> INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier, CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier, France

**Corresponding Author:**

Olaf Mercier, MD, PhD

Research and Innovation Unit, Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital

133 Avenue de la Resistance

92350, Le Plessis Robinson, France

email: o.mercier@ccml.fr

**Conflicts of Interest:** All authors state that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article

**Funding:** This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009 of the French Ministry of Health; RCB 2009-A0098057.

\* Both OM and JAA contributed equally to this study.

## **Abbreviations**

CTEPH – Chronic thromboembolic pulmonary hypertension

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

EGF – Epidermal growth factor

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FCS – Fetal calf serum

FGF-2 – Fibroblast growth factor-2

HPAEC - Human Pulmonary Artery Endothelial Cells

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1

IL-1 $\beta$  – Interleukin-1 beta

IL-6 – Interleukin-6

MCP-1 – Monocyte chemoattractant protein-1

PAH – Pulmonary arterial hypertension

PBS – Phosphate buffered saline

PASMC – Pulmonary artery smooth muscle cells

PEA – Pulmonary endarterectomy

PDGF – Platelet-derived growth factor

PEC – Pulmonary artery endothelial cells

TGF- $\beta$ 1 -Transforming growth factor beta 1

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule 1

## **Abstract**

**Background:** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension results from chronic mechanical obstruction of the pulmonary arteries following acute venous thromboembolism. However, the mechanisms that result in the progression from unresolved thrombus to fibrotic vascular remodeling are unknown. We hypothesized that pulmonary artery endothelial cells contribute to this phenomenon via paracrine growth factor and cytokine signaling.

**Methods:** Using ELISA and cell migration assays, we investigated the circulating growth factors and cytokines of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients, as well as the crosstalk between pulmonary endothelial cells and both pulmonary artery smooth muscle cells and monocytes from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension *in vitro*.

**Results:** Culture medium from the pulmonary endothelial cells of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients contained higher levels of growth factors (fibroblast growth factor-2), inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, monocyte chemoattractant protein-1), and cell adhesion molecules (vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1). Furthermore, exposure to the culture medium of pulmonary endothelial cells from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients elicited marked pulmonary artery smooth muscle cell growth and monocyte migration.

**Conclusions:** These findings implicate pulmonary endothelial cells as key regulators of pulmonary artery smooth muscle cell and monocyte behavior in chronic thromboembolic pulmonary hypertension and suggest a potential mechanism for the progression from unresolved thrombus to fibrotic vascular remodeling.

## Introduction

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a rare disease resulting from progressive mechanical obstruction of the pulmonary arteries. Surgical pulmonary endarterectomy (PEA) is the standard of care, without which patients develop progressive, lethal right heart failure<sup>1</sup>. Although the precise incidence remains unknown, it is estimated that 0.1% to 9.1% of patients who suffer an acute pulmonary embolism will develop CTEPH<sup>2</sup>. While prior studies have found that risk factors for venous thromboembolism do not increase the risk of CTEPH, 74.8% of patients in the European CTEPH Registry have evidence of prior pulmonary embolism and 56.1% of prior deep vein thrombosis<sup>3,4</sup>. Subsequently, processes other than venous thromboembolism are thought to contribute to the overall pathogenesis. Despite ongoing research, these processes remain poorly understood.

Given the close anatomic relationship between the pulmonary artery endothelium and the thrombus, it is possible that CTEPH is in part a disease of pulmonary endothelial cells (PEC). Endothelial cell dysfunction is a known contributor to the pulmonary vascular remodeling seen in idiopathic pulmonary arterial hypertension, possibly via abnormal growth factor and/or cytokine synthesis and secretion. Studies in rodent models of low-flow inferior vena cava thrombosis have shown that clot resolution occurs by inflammatory cell-dependent recanalization, and stimulation or inhibition of the inflammatory process affects overall thrombus evolution<sup>5-8</sup>.

Given their interaction with the clot, and evidence from studies of other pulmonary hypertension types, we hypothesized that PEC play a central role in the pathogenesis of CTEPH. Here, we used PEC from PEA specimens to investigate the crosstalk between the pulmonary artery endothelium and both pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and monocytes.

# **Materials and Methods**

## **Study Population and Plasma Analysis**

This study was conducted in accordance with the amended Declaration of Helsinki and approved by the institutional review board of Marie Lannelongue Hospital. Written, informed consent was obtained from all patients. PEA specimens from CTEPH patients (n=109), and pulmonary artery specimens from control patients (n=94) undergoing lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer were collected. Pulmonary arteries were harvested as far as possible from the tumor. Blood samples were collected from both groups during preoperative evaluation. Preoperative transthoracic echocardiography confirmed the absence of pulmonary hypertension (right ventricular systolic pressure less than 30 mmHg) in all control patients. The clinical characteristics of both groups are summarized in Table 1.

Plasma levels of inflammatory cytokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin-6 (IL-6), adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and growth factors epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), and transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) were measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

## **Cell Isolation, Culture and Characterization**

PEC were isolated by enzymatic digestion of PEA specimens or pulmonary arteries from a randomly generated subset of 20 patients and cultured as described<sup>9</sup>. Baseline characteristics of the included patients are summarized in Table 2. Endothelial cells were defined as CD31-

positive and desmin/vimentin-negative, and they constituted >95% of culture cells (Fig 1). All cells used in the study were between passages three and six. Briefly, Human PECs were obtained by Dispase I digestion (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) of pulmonary endarterectomy specimens (CTEPH) and a 5 cm<sup>3</sup> pulmonary artery fragment (Control) left at 37°C overnight. The suspension was filtered, plated onto 0.1% gelatin-coated wells, and grown in MCDB131 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 4 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L HEPES, 10 U/mL heparin, 1 μg/mL human endothelial cell growth supplement, and 10 ng/mL vascular endothelial growth factor (Promocell, Heidelberg, Germany). Immunomagnetic purification of P-ECs was then performed with anti-PECAM-1 (CD31) monoclonal antibody-labeled DynaBeads (Dyna, Biotech, Compiègne, France). To characterize the endothelial cell phenotype, cells were labeled with acetylated low-density lipoprotein (LDL) coupled to a fluorescent carbocyanine dye (DiI-Ac-LDL, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) and stained with antibodies against the endothelial cell-specific lectin *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1, Sigma, Lyon, France) and CD31 (Dako) (Fig1). CTEPH endothelial cells (n=3) were also characterized using flow cytometry, western blot and qRT-PCR and compared to commercial Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAEC, n=3) (Lonza). For Western blot, cells were homogenized and sonicated in phosphate-buffered saline containing protease inhibitors. 20 μg of proteins were used to quantify CD31, VE-Cadherin (CD144), vWF (von Willebrand factor), VEGFR2, p120-catenin (Abcam) and β-actin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Messenger RNA (mRNA) levels of expression of CD31, VE-Cadherin, vWF, VEGF-R2 and p120-catenin (Taqman, Applied Biosystems) were assessed by real-time quantitative polymerase chain reaction. Relative quantification was calculated by normalizing the Ct (threshold cycle) of the gene of interest to the Ct of 18S in the same sample according to the comparative Ct

method ( $\Delta\Delta\text{Ct}$  method). At least, endothelial cells were labeled with fluorophore conjugated monoclonal anti-CD31 (Sigma-Aldrich) and fluorophore conjugated anti-VE Cadherin (eBiosciences). Flow cytometry gating conditions and mean fluorescence intensity were set and normalized against isotype- and fluorophore-matched non immune IgGs, respectively. Flow cytometry results were acquired with a flow cytometer (MACSQuant; Miltenyi Biotec, Paris, France) and analyzed by FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Our results confirmed that isolated endothelial cells from CTEPH patients were human pulmonary endothelial cells (Fig.1).

PASMC were isolated from the same specimens as PEC and cultured as previously described<sup>9</sup>. To assure that isolated cells were in fact PASMC, cells from each culture were assessed for expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin by immunostaining, as previously described<sup>9</sup> (Fig 1). Briefly, Human PASMC were cultured from explants. Pulmonary arteries or Pulmonary endarterectomy specimen (diameter: 5–10 mm) were kept in DMEM at 4°C before their intimal cell layer and residual adventitial tissue were stripped off using forceps. The dissected media of the vessels was then cut into small pieces (3–5 mm), which were transferred into cell-culture flasks. To allow the PA-SMCs to grow out, the vessel tissues were incubated in DMEM supplemented with 20% FCS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin). After 2 weeks of incubation, the PA-SMCs collected in the culture medium and the vessel tissues were transferred into new cell-culture flasks. Smooth muscle cells were defined as  $\alpha$ -actin-positive and they constituted >95% of culture cells (Fig1). Cultured PA-SMCs were used between passages 1 and 3. Explants from the same pulmonary artery were usually transferred several times.



Monocytes were isolated from venous blood samples using Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Orsay, France) followed by Percoll density gradient centrifugation, as previously described<sup>10</sup>.

### **PEC Medium Effects**

The levels of growth factors (PDGF, FGF-2, EGF, TGF- $\beta$ 1), inflammatory cytokines (MCP1, IL1- $\beta$ , IL-6) and cell adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) in the PEC medium were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as per the manufacturer's instructions.

PEC were seeded in 24-well plates containing MCDB131 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well and allowed to adhere and grow for 24 hours. These cells were then cultured in growth factor-free MCDB131 medium for 24 hours, after which the medium was collected and used as PEC medium.

PASMC were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 15% FCS, seeded in 24-well plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well, and allowed to adhere. Cells were synchronized by 48 hours of growth arrest in DMEM without FCS, after which either 1ml of PEC medium or 5% FCS was added. Cells were incubated for 24 hours with [<sup>3</sup>H]thymidine (1  $\mu$ Ci/ml), washed twice with phosphate buffered saline (PBS), treated with ice-cold 10% trichloroacetic acid, and dissolved in 0.1 N NaOH (0.5 ml/well). Incorporated radioactivity was quantified and reported as cpm/well.

Monocyte chemotaxis was quantified, alone and in the presence of a MCP-1 blocking antibody, as previously described<sup>10</sup>.

## **Immunofluorescence and Histochemical Staining**

Paraffin-embedded sections (5µm thick) of pulmonary endarterectomy specimens were mounted on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, France). Slides were de-waxed in 100% toluene and rehydrated by immersion in decreasing ethanol concentrations (100%, 95%, and 70%) followed by distilled water. After blocking with phosphate buffered saline containing 1% (weight/volume) bovine serum albumin (BSA) and 0.1% (volume/volume) Tween 20, the sections were incubated at 4°C overnight with either an anti-human Von Willebrand factor (VWF) monoclonal antibody to detect endothelial cells (1/250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), an anti-human  $\alpha$ -actin antibody to detect smooth muscle cells (1/250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or an anti-human CD68 antibody to detect macrophages (1/200, ABD Serotec, France). Fluorescein-conjugated IgG (Vector Laboratories, Inc.) was used as the secondary antibody. Nuclear counterstaining using 4', 6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) was performed according to the manufacturer's recommendations. Finally, the sections were stained with hematoxylin and eosin. Qualitative and quantitative measurement of collagen matrix accumulation was assessed with collagen-specific Masson's trichrome staining<sup>1</sup>. The ratio of organized versus unorganized thrombus was measured in 10 samples (same patients included in ELISA studies).

## **Statistical Analysis**

Continuous data are reported as mean  $\pm$  standard deviation or standard error of the mean, as appropriate. Categorical variables are presented as number and percentage. Groups were compared using the Student's t-test for continuous variables and Pearson Chi-Square or Fisher's Exact Test for categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## Results

### Plasma Factor Levels

Plasma concentrations of MCP-1, IL-6 and IL-1 $\beta$  were significantly higher in CTEPH patients when compared to controls ( $525 \pm 33$  vs.  $393 \pm 23$  pg/mL,  $p=0.0410$ ;  $31.9 \pm 2.3$  vs.  $23.9 \pm 2.7$  pg/mL,  $p=0.0318$ ;  $2.76 \pm 0.4$  vs.  $1.51 \pm 0.26$  pg/mL,  $p=0.0422$ ) (Fig 2A). Plasma concentrations of adhesion molecules VCAM-1 and ICAM were also significantly higher in CTEPH patients than controls ( $567 \pm 45$  vs.  $438 \pm 27$  ng/mL,  $p=0.0083$  and  $213 \pm 9$  vs.  $166 \pm 7$  ng/mL,  $p=0.039$ , respectively) (Fig 2B). In contrast, there was no difference in the plasma concentration of growth factors FGF-2, PDGF, or EGF in control and CTEPH patients ( $16.74 \pm 7$  vs.  $17.25 \pm 9$  ng/mL,  $p=0.914$ ;  $1469.81 \pm 45$  vs.  $1545.51 \pm 27$  ng/mL,  $p=0.097$ , and  $0.51 \pm 0.03$  vs.  $0.60 \pm 0.20$ ,  $p=0.117$ , respectively). However, the plasma concentration of TGF- $\beta$ 1 was significantly higher in CTEPH patients than controls ( $18938 \pm 45$  vs.  $10801 \pm 27$  ng/mL,  $p=0.0001$ ) (Fig 2C). Increased protein levels did not correlate with disease severity (data not shown).

### CTEPH-PEC Medium Increases PASMCM Proliferation

There was no difference in the proliferative response of PASMCM from CTEPH versus control patients when exposed to 5% FCS ( $160 \pm 12$  vs.  $150 \pm 17$  cpm/well,  $p=0.732$ , and  $1286 \pm 50$  vs.  $1200 \pm 40$  cpm/well,  $p=0.825$ ) (Fig 3A). However, both control and CTEPH PASMCM showed a statistically significant increase in growth when exposed to medium from CTEPH patient PEC compared to medium from control PEC ( $970 \pm 30$  vs.  $530 \pm 27$  cpm/well,  $p=0.032$ ,  $1020 \pm 50$  vs.  $580 \pm 36$  cpm/well,  $p=0.024$ ) (Fig 3B).

## **CTEPH-PEC Medium Stimulates Monocyte Migration**

The presence of CTEPH-PEC medium in the Transwell lower chamber induced increased migration of control monocytes from the upper to the lower chamber when compared to Control-PEC medium ( $47 \pm 7$  vs.  $15 \pm 4$  cells number/field,  $p=0.0086$ ) (Fig 4A). CTEPH-PEC medium increased migration of CTEPH-monocytes when compared to Control-PEC medium ( $49 \pm 5$  vs.  $18 \pm 3$  cells number/field,  $p=0.0059$ ) (Fig 4B). This effect was significantly reduced by the presence of a MCP-1-blocking antibody. There was no difference in the migration of CTEPH and control monocytes when both were exposed to either control or CTEPH PEC medium with anti-MCP1 (Fig 4A&B).

## **Factor Production by CTEPH-PEC**

When compared to the culture media from control PEC ( $n=10$  in each group), CTEPH-PEC culture media contained significantly increased levels of known growth factors, inflammatory cytokines and ICAM-1. Specifically, levels of MCP-1, IL-6, and IL-1 $\beta$  were significantly increased in the CTEPH-PEC media compared to controls ( $3537 \pm 50$  vs.  $1038 \pm 35$  pg/mL,  $p=0.0054$ ;  $921 \pm 28$  vs.  $192 \pm 13$  pg/mL,  $p=0.0015$ ; and  $12.7 \pm 0.9$  vs.  $1.15 \pm 0.3$  pg/mL,  $p=0.00231$ , respectively) (Fig 5A), as was the level of ICAM-1 ( $1692 \pm 96$  pg/mL vs.  $307 \pm 12$ ,  $p=0.00347$ ). There was no difference in the level of VCAM-1 ( $3.84 \pm 0.70$  pg/mL vs.  $3.65 \pm 0.60$  pg/mL,  $p=0.687$ ) (Fig 5B). FGF-2 was significantly elevated in the media from CTEPH-PEC when compared to controls ( $13.2 \pm 0.40$  vs.  $2.30 \pm 0.3$  mg/mL,  $p=0.0098$ ). However, there was no difference in the levels of PDGF, EGF, or TGF- $\beta$ 1 ( $1.53 \pm 0.3$  vs.  $1.28 \pm 0.5$  pg/mL,  $p=0.0925$ ,  $4.0 \pm 0.3$  vs.  $3.7 \pm 0.5$  pg/mL,  $p=0.879$ , and  $152 \pm 45$  vs.  $220 \pm 27$  ng/mL,  $p=0.1143$ , respectively) (Fig 5C).

## **Pulmonary endarterectomy specimen composition and structure**

Representative images of the gross and microscopic appearance of surgical specimens obtained from CTEPH patients, and their composition, are shown in figure 6. The ratio of fibrous (organized thrombus) to fibrinous (unorganized thrombus), areas was 74:26 percent (Fig 6B). Organized thrombus typically contained fibroblasts/myofibroblasts, inflammatory cells (mainly lymphocytes and macrophages) and numerous neo-vessels of varying size (repermeabilization vessels).

## Discussion

In this study, we show that PEC contribute to an inflammatory state in patients with CTEPH, and that the increased production of inflammatory cytokines and growth factor FGF-2 by PEC stimulates the growth of PASMC and increases monocyte migration. To our knowledge, this is the largest study to date that examines PEC from CTEPH patients and is the first to show how changes in the pulmonary endothelium can affect other key cells. These findings underline the importance of inflammation in the overall pathogenesis of CTEPH and suggest a potential mechanism for the increased cellular proliferation and inflammatory infiltration seen in PEA specimens.

One of the fundamental questions in CTEPH is how the presence of unresolved thrombi within the pulmonary arteries leads to the chronic clot and vessel fibrosis seen in the disease. Consequently, this study focuses on the pathophysiology underlying the progression from clot to fibrosis, with our hypothesis being that changes in the pulmonary artery endothelium contribute to the pathogenic vascular remodeling seen in CTEPH. While inflammatory cytokines have been associated with other pathologic aspects of CTEPH, specifically microvascular disease and right ventricular dysfunction, these additional disease characteristics were not examined in this study<sup>11,12</sup>.

Patients with CTEPH demonstrate significant pulmonary artery remodeling and proliferation of smooth muscle cells. We found increased growth of PASMC exposed to culture medium from CTEPH-PEC. This could be due to paracrine signaling via the increased levels of FGF-2 found in CTEPH-PEC culture medium, as FGF-2 levels were not higher in CTEPH patient plasma but were significantly elevated in the culture media. This effect is similar to that seen in idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAH), where the enhanced expression or

activity of a variety of growth factors, including FGF, PDGF, and EGF, have been shown to stimulate smooth muscle proliferation and lead to obstructive pulmonary vascular remodeling<sup>13-15</sup>. While the contribution of endothelial cells to PASMC proliferation via growth factor synthesis has been studied in PAH, this is the first work to identify a similar mechanism in CTEPH<sup>9,14</sup>.

Like FGF-2, MCP-1 has also been shown to induce smooth muscle cell proliferation in PAH<sup>10</sup>. Furthermore, previous studies have shown that MCP-1 is predominantly expressed in the endothelium of CTEPH patients, suggesting that PEC could be the primary source of abnormal MCP-1 expression<sup>16</sup>. We found MCP-1 levels that were significantly higher in the culture medium from CTEPH-PEC than from control PEC, as well as significantly increased plasma levels of MCP-1 in CTEPH patients. This overexpression of MCP-1 would stimulate smooth muscle cell proliferation and may contribute to pathogenic vascular remodeling.

Additionally, MCP-1 is a strong chemoattractant for inflammatory cells and stimulant for fibrosis. MCP-1 stimulates expression of genes for both fibroblast collagen and transforming growth factor  $\beta$ 1, and stimulates both physiologic and pathologic inflammation, including that seen in atherosclerosis<sup>17,18</sup>. Monocytes from both control and CTEPH patients showed increased migration when exposed to the culture medium from CTEPH-PEC, and this effect was markedly diminished after an anti-MCP-1 antibody inhibited MCP-1. These findings suggest a central role for MCP-1 in attracting monocytes to the thrombus and vessel wall of CTEPH patients.

IL-6 is a potent pro-inflammatory cytokine previously shown to be increased in both PAH patients and CTEPH patients with isolated right ventricular dysfunction<sup>12,19,20</sup>. We found

increased IL-6 levels in culture medium from CTEPH-PEC compared to controls, further supporting PEC contribution to the inflammatory state seen in CTEPH patients. The potential role for inflammation in the pathophysiology of CTEPH has been widely proposed, and increased inflammation in CTEPH patients is not just localized to the lung but systemically manifested with increased rates of inflammatory bowel disease and higher serum levels of C-reactive protein<sup>21,22</sup>. The higher levels of IL-6 and IL-1 found in the culture medium of CTEPH-PEC suggest that PEC may stimulate this inflammatory state and are consistent with the higher plasma level of TGF- $\beta$  1 seen in CTEPH patients despite the normal TGF- $\beta$  1 level in CTEPH-PEC culture medium.

Taken in combination, increased levels of growth factors (FGF-2), pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6), and mediators of monocyte infiltration and fibrosis (MCP-1) in the medium of CTEPH-PEC suggest that PEC play a central role in the pathogenesis of CTEPH. Furthermore, we found that levels of VCAM-1 and ICAM-1 were elevated in the plasma of CTEPH patients and that the level of ICAM-1 was elevated in the culture medium of CTEPH-PEC. VCAM-1 and ICAM-1 promote monocyte adherence in response to pro-inflammatory signaling via IL-1 $\beta$  and IL-6 induced CRP, and an increase in their expression is a marker of endothelial cell activation<sup>23</sup>. PEC activation and dysfunction, as manifested by the aberrant expression of these proteins, could explain the fundamental pathological progression from an unresolved thrombus to the chronic, maladaptive vascular remodeling seen in CTEPH.

While we found increased levels of potentially pathologic molecules in CTEPH patient plasma, we did not find any correlation between these levels and the degree of the patients' pulmonary hypertension. Notably, correlations between serum levels of IL-6 and both pulmonary vascular resistance (PVR) and right atrial pressure, as well as MCP-1 and PVR, have been previously reported<sup>16,24</sup>. This study examines a larger cohort of CTEPH patients



than the previous studies, and the absence of a correlation may result from a greater diversity of patients. Furthermore, while both mean pulmonary artery pressure and PVR reflect disease severity and are closely related measures, they are different parameters. As the severity of a patient's pulmonary hypertension is likely multifactorial, it is also possible that a single cytokine, or small group of cytokines, does not entirely account for clinical status. Lastly, we examined a select subset of inflammatory cytokines, and this group may not include those that do correlate with disease severity.

Our study is largely descriptive, and therefore, it suggests a potential role for PEC in the pathophysiology of CTEPH but does not prove a causal relationship. In addition, there are several important differences between the control and CTEPH patient populations. We utilized patients undergoing lung resection for malignancy as controls. Malignancy is a known inflammatory state, and this could have decreased the differences seen in inflammatory molecule levels. However, this is unlikely to have affected the overall findings. Secondly, there were significantly more tobacco users in the control population than the CTEPH population. Smoking is also known to induce inflammation and specifically increase levels of IL-6<sup>25</sup>. As this would increase the chance of a type II, rather than a type I, error, we feel it does not affect the validity of the differences found.

## **Conclusions**

We report that CTEPH-PEC express increased levels of inflammatory cytokines (IL1, IL6, MCP-1), growth factor FGF and adhesion molecule ICAM. These findings underscore the importance of inflammation in CTEPH, and specifically suggest that PEC dysfunction may be the mechanism underlying the progression of unresolved thrombus to fibrotic vascular remodeling. Further studies investigating the trigger of this inflammation, the role of the involved inflammatory, growth or adhesion factors, and the potential role of monocytes in its initiation are needed to improve our understanding of the pathophysiology of this lethal disease.

## Acknowledgements

**Author Contributions:** OM had full access to all data in this study and accepts full responsibility for the integrity of the data and accuracy of the analysis. OM, PDa, SE, and EF designed the study. JAA, PDo, LL, FL, BD, and SE performed the experiments. OM, JAA, NBL, PDo, PDa, SE, and EF analyzed the data and prepared the manuscript. All authors approve of the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Financial/nonfinancial disclosures:** The authors report that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

**Funding:** This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009 of the French Ministry of Health; RCB 2009-A0098057.

## References

1. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004;23(4):637–648.
2. Pengo V, Lensing AWA, Prins MH, et al. Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 2004;350(22):2257–2264.
3. Tapson VF, Humbert M. Incidence and prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from acute to chronic pulmonary embolism. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(7):564–567.
4. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, et al. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH) Results From an International Prospective Registry. *Circulation* 2011;124(18):1973–1981.
5. Humphries J, McGuinness CL, Smith A, Waltham M, Poston R, Burnand KG. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) accelerates the organization and resolution of venous thrombi. *J Vasc Surg* 1999;30(5):894–900.
6. Londy FJ, Kadell AM, Wroblewski SK, Prince MR, Strieter RM, Wakefield TW. Detection of perivenous inflammation in a rat model of venous thrombosis using MRV. *J Investig Surg Off J Acad Surg Res* 1999;12(3):151–156.
7. Henke PK, Varga A, De S, et al. Deep Vein Thrombosis Resolution Is Modulated by Monocyte CXCR2-Mediated Activity in a Mouse Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(6):1130–1137.
8. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, et al. Venous Thrombosis–Associated Inflammation and Attenuation With Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(2):258–268.
9. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, et al. Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. *Circulation* 2006;113(15):1857–1864.
10. Sanchez O, Marcos E, Perros F, et al. Role of Endothelium-derived CC Chemokine Ligand 2 in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(10):1041–1047.
11. Boulate D, Perros F, Dorfmüller P, et al. Pulmonary microvascular lesions regress in reperfused chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(3):457–467.
12. Haehling S von, Bardeleben RS von, Kramm T, et al. Inflammation in right ventricular dysfunction due to thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2010;144(2):206–211.

13. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, et al. Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(1):81–88.
14. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009;119(3):512–523.
15. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal Growth Factor Receptor Blockade Mediates Smooth Muscle Cell Apoptosis and Improves Survival in Rats With Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2005;112(3):423–431.
16. Kimura H, Okada O, Tanabe N, et al. Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Pulmonary Vascular Resistance in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(2):319–324.
17. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of Fibroblast Collagen and Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Gene Expression by Monocyte Chemoattractant Protein-1 via Specific Receptors. *J Biol Chem* 1996;271(30):17779–17784.
18. Liptay MJ, Parks WC, Mechem RP, et al. Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. *J Clin Invest* 1993;91(2):588–594.
19. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, et al. Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2010;122(9):920–927.
20. Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(5):1628–1631.
21. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, et al. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;33(2):325–331.
22. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(14):1211–1218.
23. Szmitko PE. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I. *Circulation* 2003;108(16):1917–1923.
24. Zabini D, Heinemann A, Foris V, et al. Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients. *Eur Respir J* 2014;44(4):951–962.
25. McEvoy JW, Nasir K, DeFilippis AP, et al. Relationship of Cigarette Smoking With Inflammation and Subclinical Vascular Disease The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(4):1002–1010.

## Tables

**Table 1:** Baseline Characteristics of Patient Groups for Plasma Analysis

|  | Control (n=94) | CTEPH (n=109) |               | P-Value |
|--|----------------|---------------|---------------|---------|
| Age (Years)  | 62.6 ± 12.2    | 60.23 ± 14.4  |               | 0.22    |
| Sex (M/F)  |                | 58/37         | 61/48         | 0.46    |
| Smoker [n (%)]   |                | 64 (71%)      | 40 (37%)      | 0.001   |
| Mean Pulmonary Artery Pressure (mmHg)                    |                | 17.7 ± 3.5    | 46.4 ± 11.0   | 0.001   |
| Cardiac Index (liters/min/m <sup>2</sup> )               |                | -             | 2.6 ± 0.7     | -       |
| Total Pulmonary Resistance (dynes/sec/cm <sup>-5</sup> ) |                | -             | 844.8 ± 417.7 | -       |

**Table 2:** Baseline Characteristics of Patient Groups for Cell Culture

|  | Control (n=10) | CTEPH (n=10)  | P-Value |
|--|----------------|---------------|---------|
| Age (Years)  | 59.8 ± 12.0    | 66.6 ± 10.2   | 0.19    |
| Sex (M/F)  | 3/7            | 5/5           | 0.83    |
| Smoker [n (%)]   | 5 (50%)        | 3 (30%)       | 0.28    |
| Mean Pulmonary Artery Pressure (mmHg)                    | 19.6 ± 3.7     | 51.4 ± 12.1   | 0.001   |
| Cardiac Index (liters/min/m <sup>2</sup> )               | -              | 2.62 ± 0.6    | -       |
| Total Pulmonary Resistance (dynes/sec/cm <sup>-5</sup> ) | -              | 936.5 ± 294.8 | -       |

## Figure Legends:

Figure 1. (A) Culture of PASMC and PEC from control and CTEPH patients. Culture of PASMC from CTEPH surgical specimens and control patient pulmonary arteries was confirmed with fluorescence confocal images showing positive immunostaining with smooth muscle  $\alpha$ -actin (green) (A and B). Culture of PEC from CTEPH surgical specimens and control patient pulmonary arteries was confirmed with positive immunostaining with CD31 (green) (C and D). Nuclei are stained blue (DAPI). All images are at 40X. (B) Flow cytometry results comparing CTEPH endothelial cells (n=3) and commercial human pulmonary endothelial cells (HPAEC). HPAEC and CTEPH endothelial cells were CD31 and CD144 positive cells. (C) qRT-PCR results showing the same level of expression of CD31, VE-Cadherin (CD144), vWF, VEGFR2 and p120-catenin mRNAs between CTEPH endothelial cells and HPAEC. (D) CD31, VE-Cadherin (CD144), vWF, VEGFR2 and p120-catenin protein levels calculated with Western blot analysis were not different between HPAEC and CTEPH endothelial cells.

Figure 2. Plasma levels of cytokines, adhesion molecules and growth factors in control (n=94) and CTEPH (n=109) patients. (A) Plasma levels of inflammatory cytokines MCP-1, IL-6 and IL-1 $\beta$  were significantly higher in CTEPH patients versus control. (B) Circulating levels of the cellular adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 were also significantly increased in CTEPH patient compared to controls. (C) There was no difference in the plasma levels of the growth factors FGF2, PDGF or EGF are added between control and CTEPH patients. Data is expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 3. Exposure to CTEPH pulmonary endothelial cell culture medium increases pulmonary artery smooth muscle cell growth. (A) As marked by incorporation of [ $^3$ H]

thymidine, there was no difference in the growth of control versus CTEPH pulmonary vascular smooth muscle cells either at baseline (without treatment) or after exposure to 5% fetal calf serum. (B) Both control and CTEPH- PASMCM showed significantly increased growth, as marked by incorporation of [<sup>3</sup>H] thymidine, when exposed to culture media from CTEPH-PEC than when exposed to culture media from control PEC. PASMCM proliferation increased in response to CTEPH-PEC media regardless the origin of the PASMCM. Data is expressed as mean ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 4. Effect of CTEPH-PEC culture media on monocyte migration. Exposure to CTEPH-PEC culture media significantly increased the migration of both control (A) and CTEPH (B) monocytes compared to culture media from control PEC. This effect was completely abolished in the presence of an anti-MCP1 antibody. Data is expressed as mean of cells per field ± SEM. \*p<0.01.

Figure 5. CTEPH-PEC show increased production of inflammatory cytokines, adhesion molecules and growth factors in their culture media. (A) The levels of inflammatory cytokines MCP-1, IL-6, and IL-1β were significantly increased in the culture media of CTEPH-PEC compared to controls. (B) The level of ICAM-1 was higher in culture media from CTEPH PEC than from control PEC. There was no difference in the level of VCAM-1. (C) The level of FGF-2 was significantly higher in CTEPH-PEC culture media than in control PEC culture media. There was no difference in the levels of PDGF or EGF. Data is expressed as mean ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Figure 6. Pulmonary endarterectomy specimen with partially organized thromboembolic material. (A) Gross morphology of surgical specimen showing large, central, fresh thrombus with fibrous extension into segmental arteries. (B) Masson's trichrome staining of rganized, collagen-rich material (blue), and recent, non-organized fibrin-rich material (red). The



organized portion was estimated at 65 per cent. Low magnification (10x). (C) Fibrinous, fresh thrombotic portion (red), with peripheral organization by fibroblasts/myofibroblasts (arrows). Red-brownish material (bottom) corresponds to the most recent deposit, comprised of erythrocytes and platelets. (D) Organized, collagen-rich portion of the thrombus; the dense tissue is rich in fibroblasts/myofibroblasts (red arrows), accumulations of lymphocytes and other inflammatory cells (blue arrow), and numerous repermeabilization-vessels (black arrows). Note the black pigment (top, left) corresponding to iron deposits, a sign of erythrocytic degradation. (E) Macrophages appear green after staining with anti-human CD-68 antibodies. (F) Staining with an anti-human VWF antibody and an anti-human  $\alpha$ -actin antibody, respectively, demonstrates VWF-positive endothelial cells (red) and  $\alpha$ -actin-positive smooth muscle cells (green). Nuclei were counterstained with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI), and appear blue (E and F). These images are at a magnification of 40X.

Figure 1A  
[Click here to download high resolution image](#)

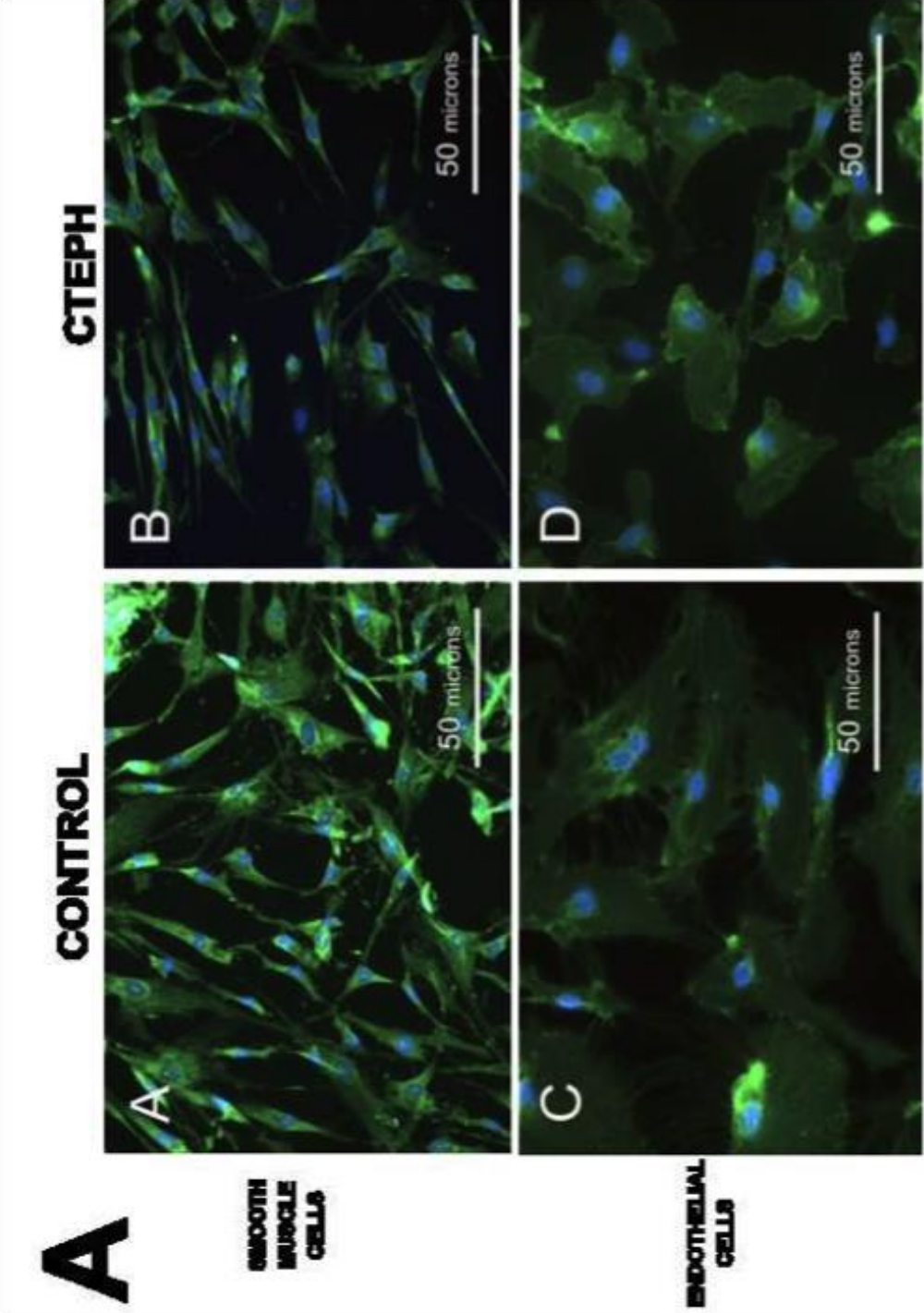
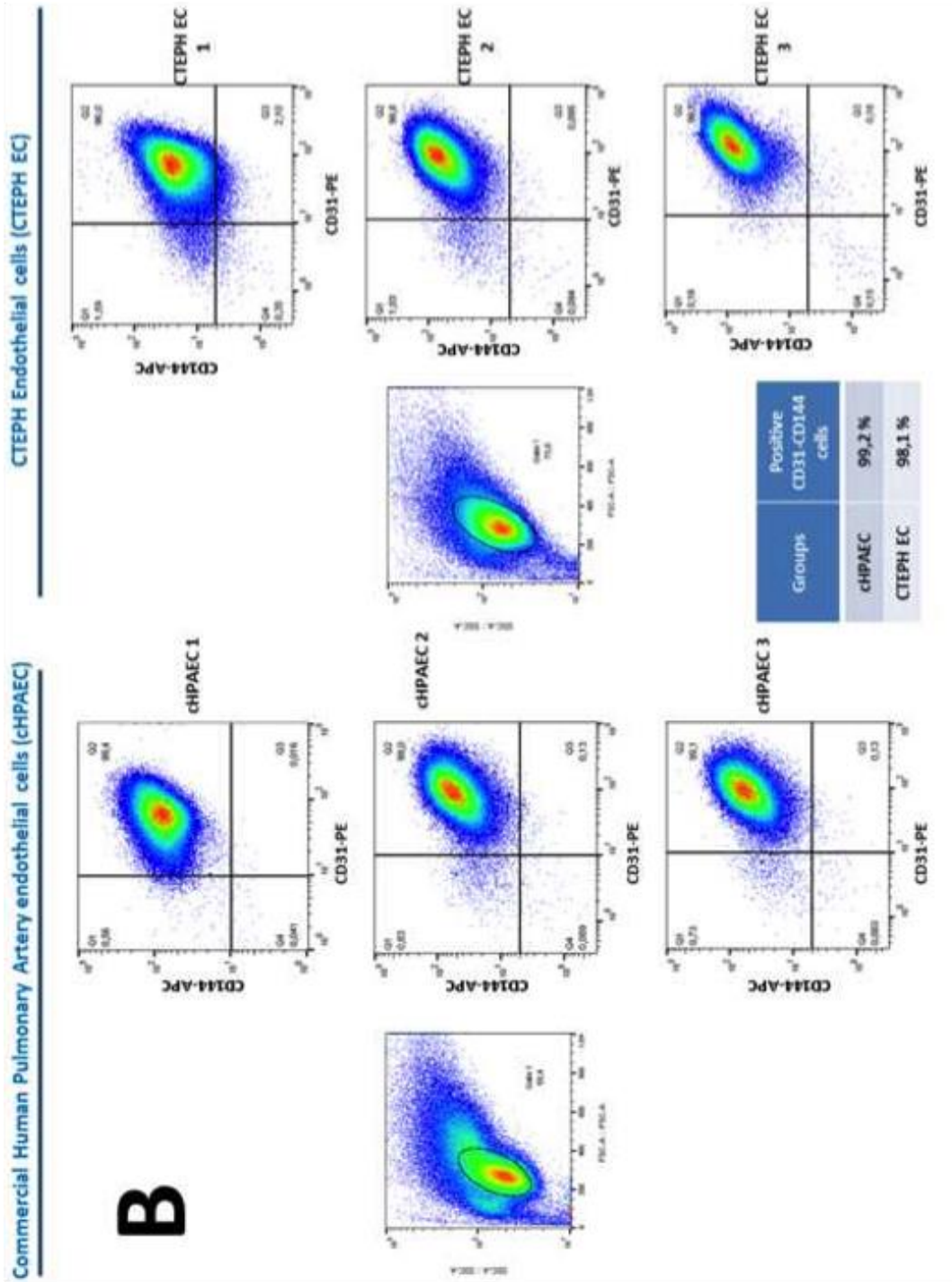


Figure 1B  
[Click here to download high resolution image](#)



**C**

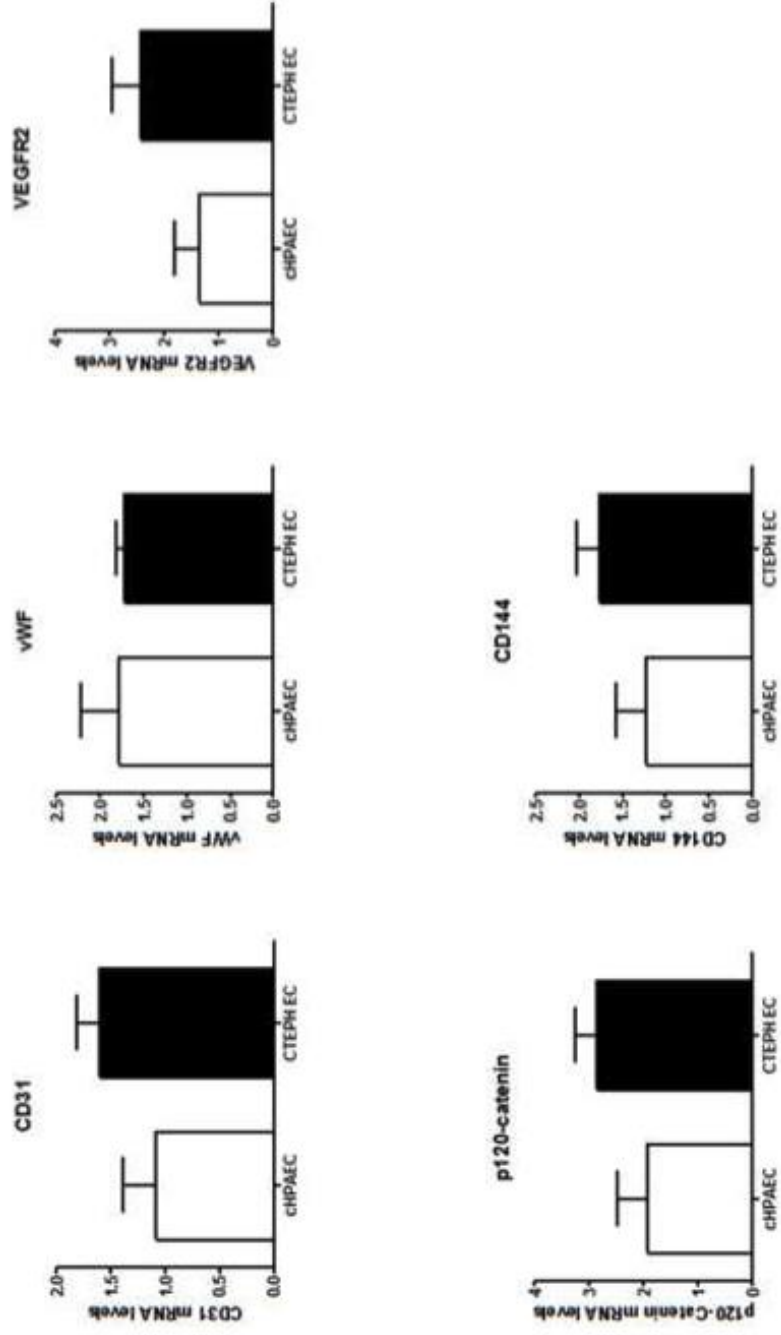


Figure 1C [Click here to download high resolution image](#)

Figure 1D  
[Click here to download high resolution image](#)

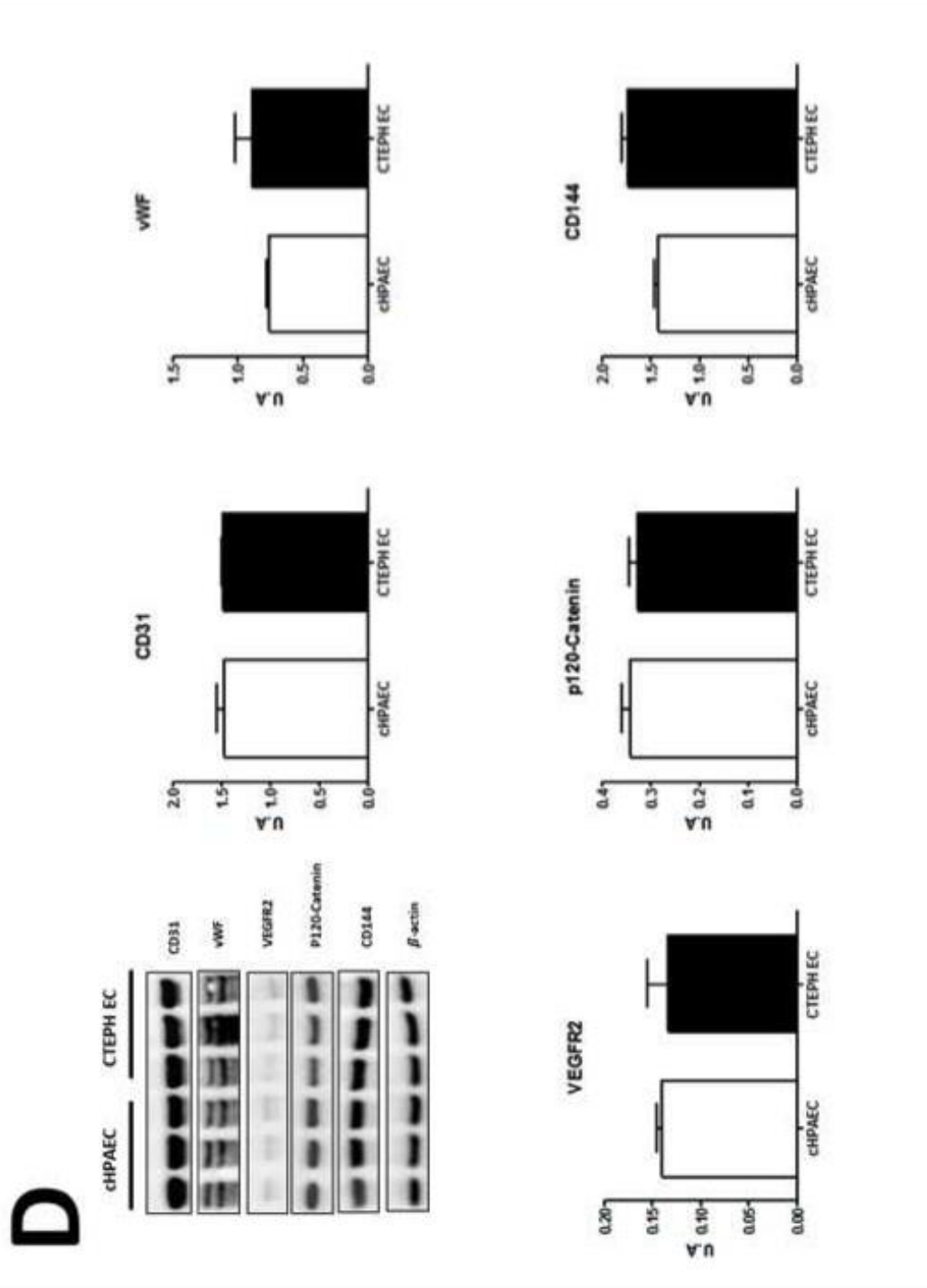


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

**Figure 2. Plasma levels of cytokines and adhesion molecules**

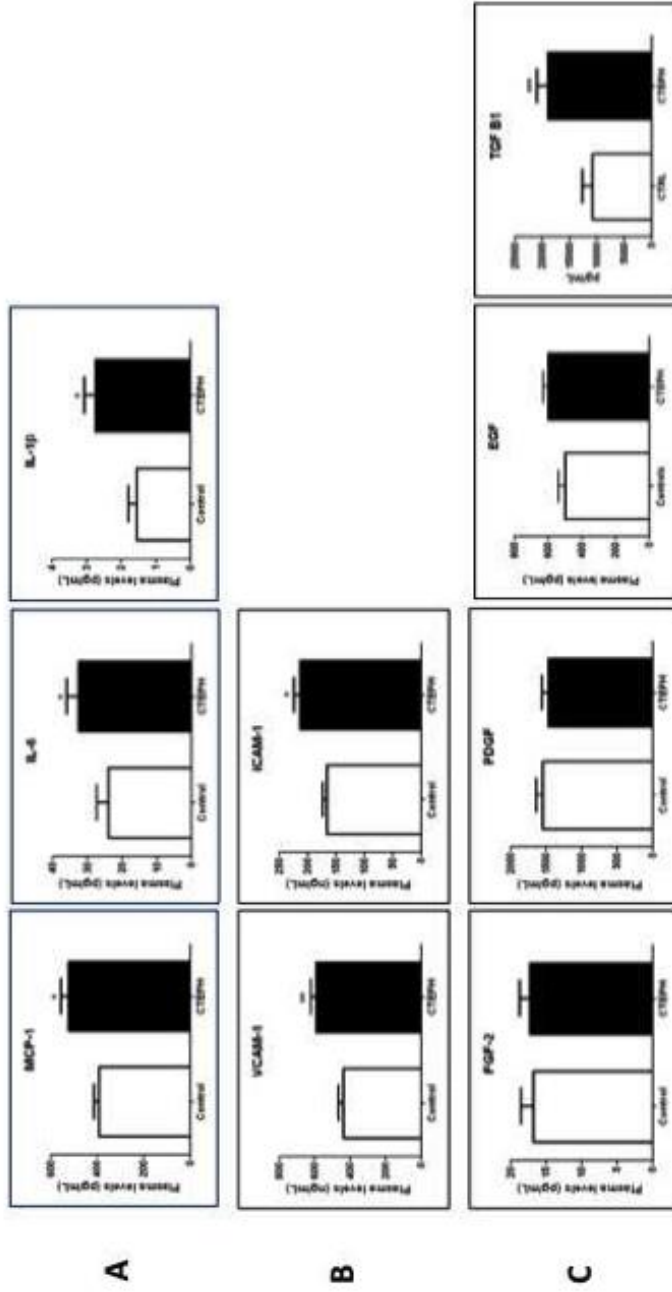


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 3. Pulmonary artery smooth muscle cell growth

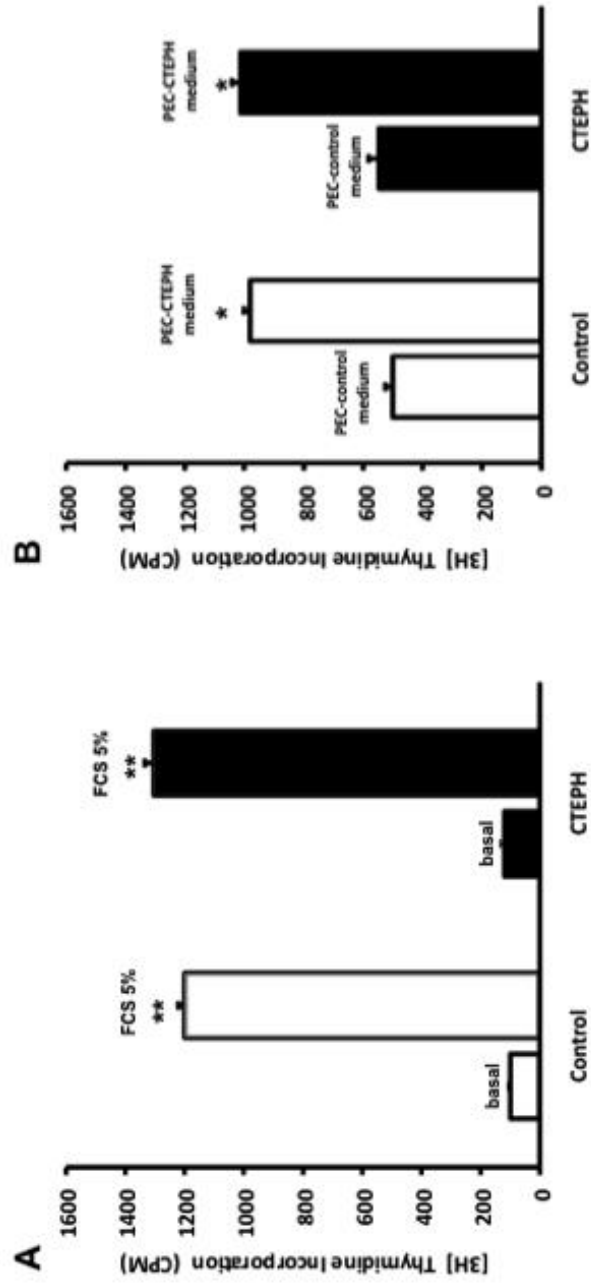


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

**Figure 4. Effect of endothelial cell medium on monocyte migration**

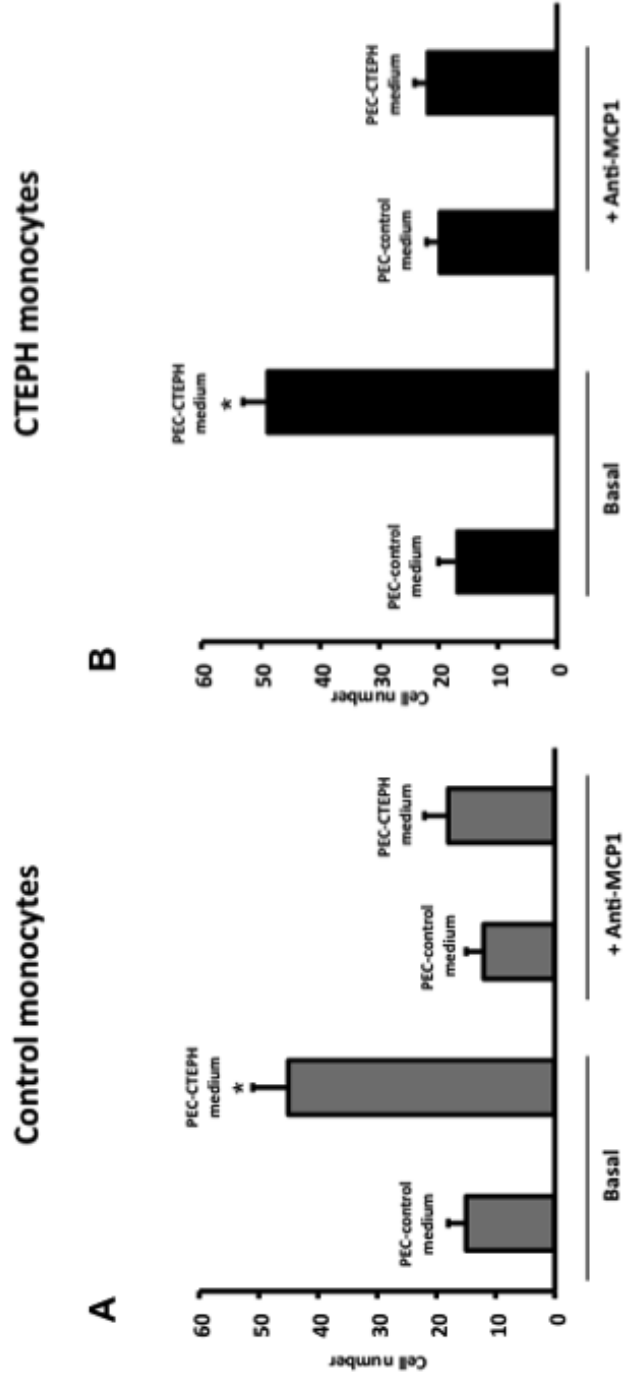
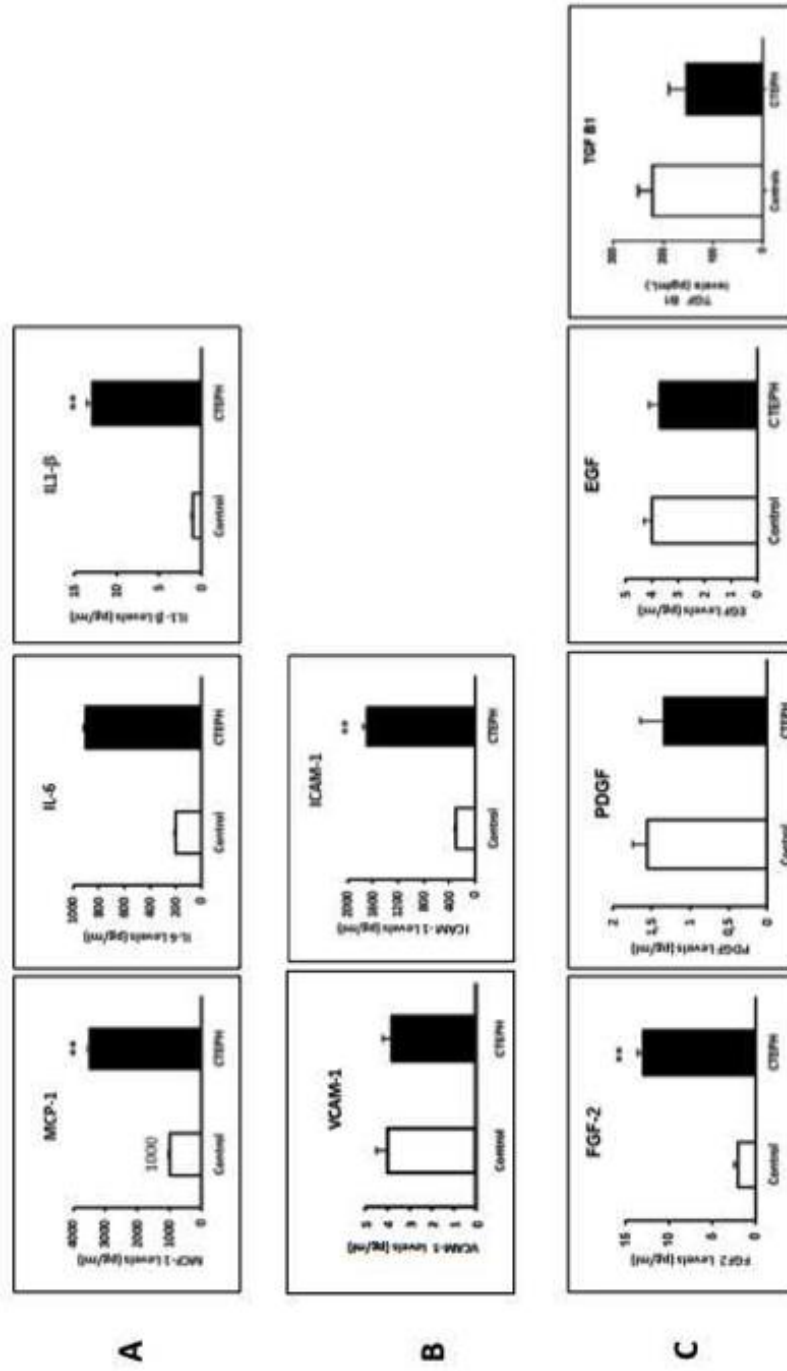


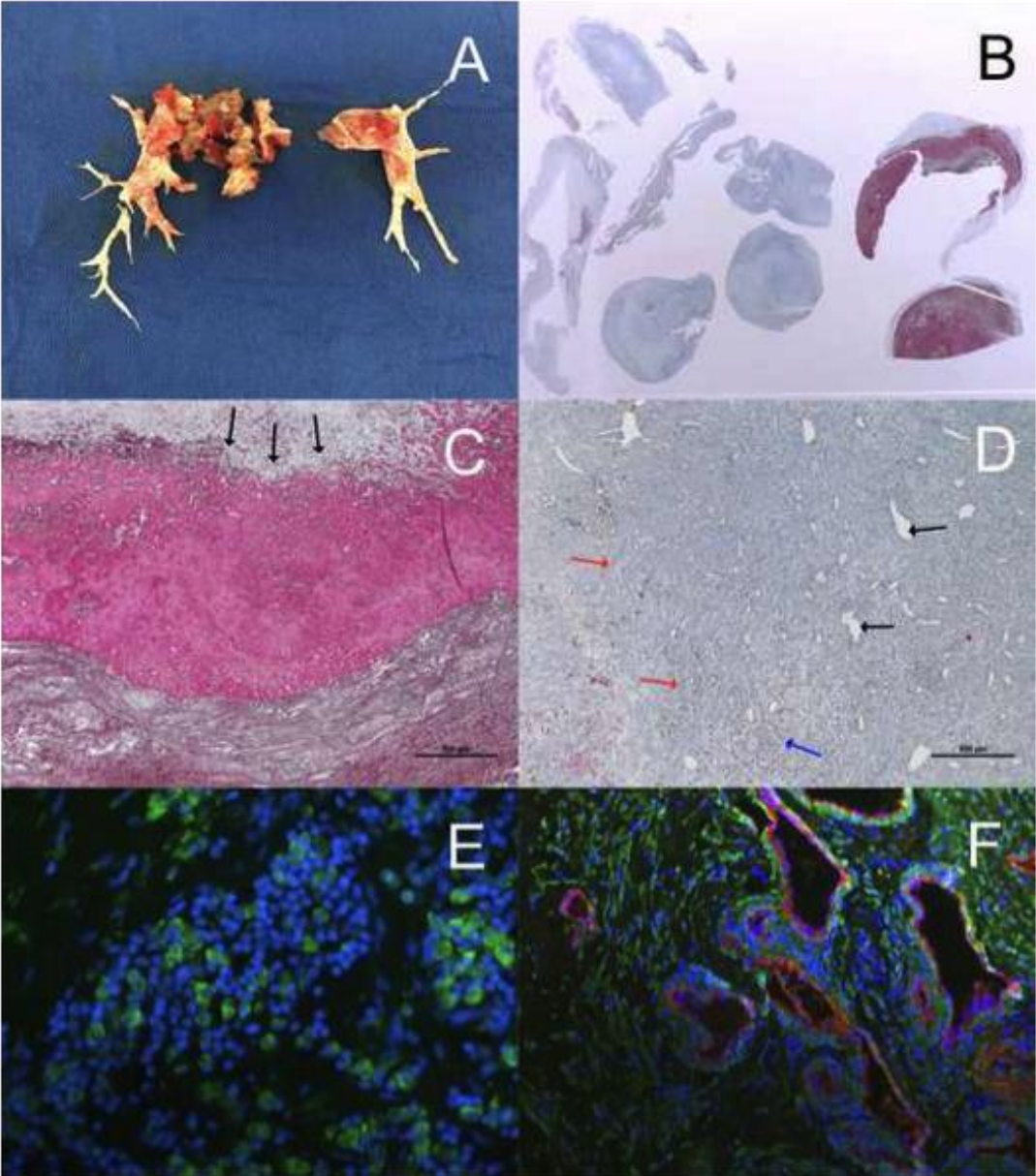


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

**Figure 5. Endothelial cell cytokine and adhesion molecule synthesis**



**Figure 6**  
[Click here to download high resolution image](#)



## **Etude 2 : « A New Facet of Endothelial Intercellular Cell Adhesion Molecules In The Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension »**

**Soumis à AJRCCM**

### ***Introduction et hypothèse***

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE) est une complication de l'embolie pulmonaire aiguë et elle est caractérisée par la présence et la persistance d'un séquestre dans les artères pulmonaires.

Cette maladie est curable chirurgicalement par endartériectomie pulmonaire. Toutefois, la physiopathologie de l'HPPE est un processus complexe et multifactoriel. Nous avons montré dans le travail précédent que le dysfonctionnement des cellules endothéliales qui est en contact direct avec la thrombose joue un rôle clé dans son maintien et le remodelage vasculaire. Nous avons montré une augmentation significative de la forme soluble d'ICAM-1 (molécule d'adhésion) dans le surnageant des cellules endothéliales des patients HPPE. La protéine ICAM-1 est une immunoglobuline synthétisée par la CE et dont la fonction est de promouvoir l'adhésion et la transmigration des leucocytes circulants en se liant et en activant son récepteur LFA-1 à la surface de ces cellules. Elle est impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies cardiovasculaires. De même, il semble être décisif dans les événements très précoces du processus thrombotique. Ainsi, nous avons donc voulu étudier son expression, sa régulation et son rôle dans la physiopathologie de l'HPPE.

### ***Résultats et discussion***

Sur des coupes de séquestres, nous avons montré que les protéines ICAM-1 et son récepteur LFA-1 sont principalement localisées au niveau des cellules endothéliales.

Nous avons validé les premières données et nous avons montré, par western blot, une nette augmentation d'ICAM-1 dans les CE des patients atteints d'HPPE. Cette augmentation est spécifique à l'HPPE car on ne la retrouve pas dans l'HTAPi.

Le récepteur d'ICAM-1 (LFA-1) étant présent à la surface des cellules endothéliales, nous avons étudié les conséquences de l'inhibition de la synthèse d'ICAM-1 et du blocage de son récepteur (après traitement par l'A205804 ou l'A286982) sur la survie des cellules endothéliales de sujets

contrôles et de patients atteints d'HPPE. Les résultats montrent que l'inhibition de la synthèse et de l'action d'ICAM-1 après traitement des CE par ces molécules (à concentrations croissantes 50 - 500 nM) induit une nette diminution du nombre de cellules viables et une augmentation des cellules en apoptose. Ce phénomène est plus marqué dans les CE d'HPPE. Ceci suggère que la protéine ICAM-1 intervient dans la survie des cellules endothéliales, un processus clé dans la physiopathologie de l'HPPE.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires intervenant dans ces processus et en particulier dans la survie des cellules endothéliales, nous avons étudié les voies de signalisation impliquées en réponse à ICAM-1 avec comme candidat potentiel la voie Src, P38, ERK et la survivine. ICAM-1 semble jouer un rôle clé car celui-ci module les différents facteurs de sa voie de signalisation. En effet, lorsque l'expression d'ICAM-1 est inhibée, l'expression et l'activation de Src, p38 et ERK sont effondrées.

Nous avons également étudié les mécanismes à l'origine de la surexpression d'ICAM-1 chez les patients HPPE en recherchant une prédisposition génétique. Nous savons que le polymorphisme SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Exon 6 (E469K) est souvent associé aux maladies cardiovasculaires. Nous avons donc étudié le polymorphisme du gène codant ICAM-1 et observé la répartition allélique chez les patients HPPE est différente de celle chez des sujets sains. Nous avons donc inclus 128 patients HPPE et 119 sujets sains de même âge et de même sexe. La répartition du génotype ICAM-1 E469K était significativement différente entre les témoins et les patients HPPE avec une prédominance de l'allèle E dans l'HPPE ( $p < 0,01$ ). Toutefois, nous n'avons pas établi de corrélation entre le génotype et la sévérité de l'hypertension pulmonaire dans la population HPPE.

### **Conclusion**

Dans cette étude, nous avons démontré le rôle autocrine d'ICAM-1 dans le maintien du phénotype anormal de la CE dans l'HPPE.

**Abstract Word Count:** 240  
**Text Word Count:** 5429

## **A New Facet of Pulmonary Endothelial Intercellular Cell Adhesion Molecules In The Pathogenesis of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension**

**Authors:** Jennifer Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Stephanie Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Joanna Arthur Ataam, MSc<sup>4</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>

**Academic Affiliations:**

<sup>1</sup> Research and Innovation Unit, INSERM U999, DHU TORINO, Paris Sud University, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>3</sup> Department of Pathology, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>4</sup> INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier, CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier, France

**Corresponding Author:**

Saadia EDDAHIBI, PhD  
INSERM U1046, CNRS UMR 9214  
Université de Montpellier,  
CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier,  
371 Avenue du Doyen Gaston Giraud  
34295, Montpellier, France  
email: saadia.eddahibi@inserm.fr

**Conflicts of Interest:** All authors state that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article

**Funding:** This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009 of the French Ministry of Health; RCB 2009-A0098057.

## **Abbreviations**

CTEPH – Chronic thromboembolic pulmonary hypertension

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FCS – Fetal calf serum

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1

LFA-1 – Leucocyte Function Antigen 1

PAH – Pulmonary arterial hypertension

PBS – Phosphate buffered saline

PASMC – Pulmonary artery smooth muscle cells

PEA – Pulmonary endarterectomy

PEC – Pulmonary artery endothelial cells

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

## **Abstract**

**Rationale :** Pulmonary endothelial cell (P-EC) plays a key role in the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). We recently reported that Endothelial Intercellular Cell Adhesion Molecules (ICAM-1) is markedly overproduced by P-ECs in CTEPH. ICAM-1 protein is an immunoglobulin involved in adhesion and transmigration of circulating leukocytes, involved in the pathogenesis of many cardiovascular diseases and in the thrombotic process. We hypothesized that ICAM-1 may have a role in the pathogenesis of CTEPH.

**Methods & Results:** We demonstrated that ICAM-1 overexpression was maintained in vitro in isolated and cultured P-ECs. ICAM-1 seems to play a key role in the P-ECs growth and apoptosis resistance, two parameters largely higher in CTEPH than in controls ( $p < 0.001$ ). Indeed, pharmacological inhibition of ICAM synthesis or activity normalized sensitivity to apoptosis and proliferative potential in the P-ECs from CTEPH. The excessive autocrine release of endothelial-derived ICAM-1 contributes to the acquisition and maintenance of an abnormal EC phenotype, by enhancing proliferation and decreasing apoptosis through phosphorylation of Src, p38 and ERK1/2 and also overproduction of survivin. The frequency of genotype ICAM-1 E469K was significantly different between control ( $n=119$ ) and CTEPH patients ( $n=128$ ) with a predominance of KE in CTEPH ( $p < 0.001$ ). However we did not established any correlation between the genotype and the pulmonary hypertension severity in CTEPH population.

**Conclusion:** ICAM-1 participates in maintaining abnormal P-EC phenotype in CTEPH. ICAM-1 KE genotype is associated with CTEPH without any correlation on disease severity.

## Introduction

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) results from obstruction of the pulmonary vascular bed by non-resolving thromboemboli [1]. Although anatomic resolution of acute embolism is often incomplete, sufficient resolution occurs in the majority of patients to restore normal pulmonary haemodynamics associated with return to a pre-embolism functional status [2]. However, several prospective studies have reported that between 0.6 and 4.6 % of patients with acute pulmonary emboli will develop symptomatic CTEPH [3, 4].

The pathophysiology of CTEPH remains unclear. The disease represents the consequences of thrombus resolution's failure after the establishment of thrombosis within the elastic pulmonary arteries. Thrombotic material becomes fibrosis, with occlusive vascular remodeling and the development pulmonary hypertension and right ventricular heart failure [7, 8]. Surprisingly, risk factors classically associated with thrombosis, such as antithrombin deficiency, protein C and S [11], prothrombin mutations and factor V Leiden, are not independently associated with CTEPH [5 - 13]. The pathophysiology of the CTEPH is a complex multifactorial and unknown process resulting in abnormal resolution of pulmonary embolism [5 - 13]. Our hypothesis was that pulmonary endothelial dysfunction promotes the organization and non-resorption of fresh pulmonary embolism. We showed in a previous work that the abnormal phenotype of endothelial cells directly in contact with the clots plays a key role in its maintain and its remodeling.

We have shown that there is a dysfunction of pulmonary endothelial cells (PEC) in CTEPH patients compared to controls. PEC of CTEPH patients significantly released more interleukins (IL-1, IL-6), chemokine (MCP-1) and growth factors (FGF-2). The direct result is a monocyte recruitment and proliferation of fibroblast cells, two key components in the clot organization mechanisms. Interestingly, we have also demonstrated a significant increase in soluble ICAM-1 (Intercellular cell adhesion molecules) level in the supernatant of endothelial



cells of CTEPH patients.

ICAM-1 protein is an immunoglobulin synthesized by the EC whose function is to promote the adhesion and transmigration of circulating leukocytes by binding and activating its LFA-1 receptor on the surface of these cells [14, 17, 19]. ICAM-1 is involved in the pathogenesis of many cardiovascular diseases. Polymorphism SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Exon 6 (E469K) is often associated to cardiovascular disease [20]. Similarly, it seems to be decisive in the very early events of the thrombotic process [14 - 18].

In this study, we focus our work on the role of ICAM-1 in the pathogenesis of abnormal phenotype of CTEPH pulmonary endothelial cell.

We hypothesized that ICAM-1 may drive the mis-resolution of pulmonary clots by inducing abnormal pulmonary endothelial cells function. Hence we investigated the impact of ICAM-1 on the proliferation and apoptosis processes of CTEPH and control P-EC. At least, we compared ICAM-1 genotype polymorphism in a CTEPH and control population.

So in the second part of this study, genotyping was performed on genomic DNA blood samples from subjects with CTEPH and controls (healthy subjects without cardiovascular history).

## **Material and methods**

### **Study population**

This study was conducted in accordance with the amended Declaration of Helsinki and approved by the institutional review board of Marie Lannelongue Hospital and approved by our institutional Ethics Committee (CPP Ile-de-France, Le Kremlin Bicêtre : C0-09-015 ; Biobanking declaration : DC-2009-1032). Written, informed consent was obtained from all patients. Pulmonary Endarterectomy (PEA) specimens from CTEPH patients (n=183), and pulmonary artery specimens from control patients (n=119) undergoing lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer, were collected. Pulmonary arteries were harvested as far as possible from the tumor. Blood samples were collected from both groups during preoperative evaluation. Preoperative transthoracic echocardiography confirmed the absence of pulmonary hypertension (right ventricular systolic pressure less than 30 mmHg) in all control patients.

### **Immunofluorescent staining**

5- $\mu$ m-thick paraffin sectioned tissues of PEA specimens, PECs from controls and from CTEPH patients were fixed with 4% paraformaldehyde.

Slides were dewaxed in 100% toluene, and the sections were then rehydrated by immersion in decreasing ethanol concentrations (100%, 95%, and 70%) and then in distilled water. After blocking with PBS containing 1% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Tween 20, the sections and PECs were incubated with anti-human ICAM-1, CD11a and CD18 monoclonal antibody, with anti-human CD31 monoclonal antibody (1/40, DAKO), anti-human  $\alpha$ -actin (1/200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or anti-human CD68 (1/200, ABD Serotec, France) at 4°C overnight.

Staining was followed by incubation with anti-mouse Alexa 488 or anti-rabbit Alexa 597 secondary antibodies (Molecular Probes, Life Technologies) for 1 h. Nuclear counterstaining, 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) was used, according to the manufacturer's recommendations. Images of each stained were captured and visualized using epifluorescence microscopy (Nikon fluorescence microscope).

### **Isolation and Culture of Human P-ECs**

PEC were isolated by enzymatic digestion of PEA specimens or pulmonary arteries from a randomly generated subset of 20 patients and cultured as described. Endothelial cells were defined as CD31-positive and desmin/vimentin-negative, and they constituted >95% of culture cells. All cells used in the study were between passages three and six. Briefly, Human PECs were obtained by Dispase I digestion (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) of pulmonary endarterectomy specimens (CTEPH) and a 5 cm<sup>3</sup> pulmonary artery fragment (Control) left at 37°C overnight. The suspension was filtered, plated onto 0.1% gelatin-coated wells, and grown in MCDB131 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 4 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L HEPES, 10 U/mL heparin, 1 µg/mL human endothelial cell growth supplement, and 10 ng/mL vascular endothelial growth factor (Promocell, Heidelberg, Germany). Immunomagnetic purification of P-ECs was then performed with anti-PECAM-1 (CD31) monoclonal antibody-labeled DynaBeads (Dyna, Biotech, Compiègne, France). To characterize the endothelial cell phenotype, cells were labeled with acetylated low-density lipoprotein (LDL) coupled to a fluorescent carbocyanine dye (DiI-Ac-LDL, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) and stained with antibodies against the endothelial cell-specific lectin *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1, Sigma, Lyon, France) and CD31 (Dako).

### **Quantitative determination of ICAM-1 and LFA-1 mRNA levels.**

ICAM-1 and LFA-1 expression was examined in P-ECs from CTEPH patients and from controls (n=20 in each group). Total RNA was extracted using phenol chloroforme method and its concentration was determined using standard spectrophotometric techniques. Then, mRNA levels was estimated by qRT-PCR. First, reverse transcription was performed using Quantitect reverse transcription (Qiagen). For qPCR, we used Taqman primer for ICAM-1 and LFA-1 (Applied Biosystems). To avoid inappropriate amplification of residual genomic DNA, intron-spanning primers were selected and internal control 18S rRNA primers (Applied Biosystems). For each sample, the amplification reaction was performed in duplicate using Taqman Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers. Signal detection and result analysis were achieved using Step one plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Expression of the gene of interest was computed to the expression of the internal standard r18S using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### **ICAM-1 pathway activation in PECs from controls and from CTEPH**

To assess the consequence of ICAM-1-induced activation of downstream effector proteins in particular those involved in endothelial growth and resistance to apoptosis. Steady state of Src, p38 and ERK phosphorylation were estimated. Also survivin protein level was measured in PEC from controls and from CTEPH incubated in the presence of two doses of two ICAM-1 inhibitors A205804 (inhibitor of ICAM-1 synthesis : I1) or A286982 (inhibitor of ICAM-1 activity : I2) or vehicle.

### **Western Blotting analysis**

PECs from controls and from CTEPH patients (n=10 in each group) were seeded in 6-well plates pre-coated with 0.1% gelatin at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well and allowed to adhere and grow in the same medium for 24 hours. The PECs were then serum starved in MCDB131

medium for the next 24 hours. Then PECs were treated or not with increasing concentration of each A286982 or A205804. Then cells were washed twice with ice-cold PBS, released by scrapping, pelleted and lysed in RIPA buffer supplemented with protease/phosphatase inhibitor cocktail. Following incubation for 45 minutes on ice, the cell lysate was obtained by centrifugation at 4,000 g for 10 min at 4°C. Protein concentration of lysates was determined by BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

10-20 µg of total proteins were resolved onto 4-12% SDS-PAGE (NuPage, Novex, Life Technologies). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Hybond, Amersham) and blocked for 1 h at room temperature with 5% non-fat dry milk in TBST (TBS and 0.5% Tween 20). Incubation with specific primary antibodies (ICAM-1, CD11a, CD18, Src, p-Src, ERK, p-ERK, p38, phospo-p38, survivin and β-actin) was performed in blocking buffer overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG was used as secondary antibody. Immunoreactive bands were detected by ECL chemiluminescent substrate (Perkin Elmer). Membrane stripping by incubating the membrane in Restore western blot stripping buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions.

### **Proliferation assays**

PECs from controls and CTEPH patients (n=7 in each groups) were seeded in 96-well plates pre-coated with 0.1% gelatin at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well and allowed to adhere and grow in the same medium for 24 hours. The PECs were then serum starved in MCDB131 medium for the next 24 hours. Then PECs were treated with 50 nM or 500 nM of A286982 or A205804, or vehicle for 24 hours. Cell growth was then measured by using the Cell Proliferation ELISA BrdU Kits (Sigma-Aldrich). Each measurement was performed in triplicate.

### **Apoptosis assays**

PECs from controls and from CTEPH patients (n=7 in each groups) were seeded in 6-well plates pre-coated with 0.1% gelatin at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well and allowed to adhere and grow in the same medium for 24 hours. The PECs were then serum starved in MCDB131 medium for the next 24 hours. Then PECs were treated with 50 nM or 500 nM of A286982 or A205804 or vehicle for 24 hours. PEC were fixed with ice-cold paraformaldehyde and subjected to a TUNEL-based in situ cell death detection assay. TUNEL signals were detected and visualized with immunofluorescence formation using a standard protocol provided by manufacturer (DeadEnd TUNEL System, Promega). Quantification of the nuclear positive signals in each group was performed by counting at least 20 randomly selected images at high-power fields under microscopy and the positive cells were quantified.

### **Genotype Analysis**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of controls and small tissues fragments of patients with CTEPH using salt phenol chloroform method and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. The total volume of the polymerase chain reaction (PCR) mixture was 25  $\mu\text{L}$  and contained 200 ng genomic DNA, 25 pM of each primer, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5  $\mu\text{L}$  PCR buffer 5x, and 1U of Taq polymerase. The forward primer was 5'-GGA-ACC-CAT-TGC-CCG-AGC-3' and the reverse primer was 5'-GGT-GAG-GAT-TGC-ATT-AGG-TC-3'. Amplification was carried out in a ThermoFisher thermal cycler using a thermal profile of initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 2 min, followed by 30 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $61^{\circ}\text{C}$  for 30 s and primer extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 60 s, and a final extension step at  $72^{\circ}\text{C}$  for 5 min. The 223 bp PCR product was digested by BstU1 (Bsh1236I) restriction enzyme and was incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. After digestion, PCR products were identified by electrophoresis on 2.5% agarose gel. The E allele has one BstU1 cleavage site and digested

to 136 and 87 bp fragments, whereas the K allele has no cleavage site and produces 223 bp fragment only.

### **Statistics Analysis**

Continuous data are reported as mean  $\pm$  standard deviation or standard error of the mean, as appropriate. Categorical variables are presented as number and percentage. Groups were compared using the Student's t-test for continuous variables and Pearson Chi-Square or Fisher's Exact Test for categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## **Results**

### **Localization of ICAM-1 and its receptor LFA-1 in the thrombus of CTEPH**

Double labeling with either ICAM-1 and CD31 or  $\alpha$ -actin were used to investigate the localization of the protein in pulmonary endarterectomy specimens sections from CTEPH patients. As shown in figure 1 immunohistochemical analysis reveals exclusive localization of ICAM-1 in endothelial cells (Figure 1). No staining was observed in smooth muscle cells.

### **Expression of ICAM-1 and its receptor LFA-1 in cultured PECs**

Using quantitative RT-PCR, we found that ICAM-1-mRNA levels in PECs were approximately three fold higher in patients with CTEPH as in controls ( $p < 0.01$ ) whereas LFA-1 mRNA expression did not differ between controls and patients (Figure 2 A and B). In accordance with mRNA state, the levels of ICAM-1 protein (illustrated by immunofluorescence and estimated by Western blot analysis) in PECs was markedly higher in patients with CTEPH than in controls (Figure 3 A and B). To determine whether P-ECs had similar or distinct phenotypes in patients versus controls, we examined the immunohistochemical characteristics of the cells. Immunofluorescence showed that P-ECs from patients with CTEPH and from controls produced similar levels of positive staining with antibody against CD31.

### **ICAM-1 inhibition reduced human P-ECs proliferation and increased apoptosis**

Incubation of P-ECs in the presence of FCS produced an increase in BrdU incorporation that was more marked in P-ECs from CTEPH than in controls (Figure 4A). Pre-treatment of cells with increasing concentrations of Inhibitor 1 I1 : A205804 or Inhibitor 2 I2 : A286982, (inhibitor of ICAM-1 synthesis I1 and activity I2 respectively) completely inhibited the cells proliferation in a dose-dependent manner with a maximal effect observed at 500 nM, this



concentration completely abolished the BrdU incorporation, causing DNA synthesis to return to a similar basal level in P-ECs from patients and from controls.

In parallel experiments, we used TUNEL technique to look for differences in apoptosis between control and CTEPH P-ECs. After serum deprivation for 24 hours, we found a significant apoptosis cells among control compared with CTEPH P-ECs (Figure 4B). When the cells were incubated in the presence of low levels of FCS, we observed a week level of apoptotic cells which remained higher in controls than in CTEPH. However inhibition of ICAM-1 synthesis or action increased the number of apoptotic cells in a dose-dependent manner, but the values remained lower in CTEPH as compared to controls ( $p < 0.001$ ).

#### **Differential effects of ICAM-1 on its signaling pathways in PEC's**

To assess the consequence of ICAM-1 activation on phosphorylation and/or expression of downstream effector proteins such as Src, p38, ERK and survivin, we evaluated their expression after ICAM-1 synthesis or activity inhibition in growing P-ECs from controls and from CTEPH patients. As shown in the left panel of figure 5, the expression and phosphorylation of Src (Figure 5A) p38 (Figure 5B), ERK (Figure 5C) and survivin (Figure 5D) were more marked in P-ECs from CTEPH than from controls, but the signal was significantly reduced after P-ECs treatment with each Inhibitor 1 I1 : A205804 or Inhibitor 2 I2 : A286982. In accordance with the immunofluorescence, immunoblot analysis (right panel) showed that the protein levels were more marked in P-ECs isolated from patients with CTEPH compared with those isolated from control subjects. Incubated of the cells in the presence of I1 or I2 inhibited expression and phosphorylation of Src (Figure 5A), p38 (Figure 5B), ERK (Figure 5C) and survivin (Figure 5D) and reduced the difference between the cells from the two groups.

### **Distribution of ICAM-1 genotypes in patients with CTEPH versus controls.**

The distribution of ICAM-1 genotypes in 183 CTEPH patients and 119 controls was assessed. Patients and controls did not differ with respect to age and sex, and all subjects were caucasians people. The ICAM-1 genotypes in CTEPH and controls were distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium. Table 1 summarises allelic frequencies, carriage rates, and genotypes of ICAM-1 gene in CTEPH patient groups and controls (Table 1). The allelic frequency of K469 was significantly lower in patients with CTEPH than in controls (allelic frequency:  $\chi^2=13,0718$ ,  $p_c= 0.0003$ ). However we did not observed any correlation between the genotype and either on PH severity (Table 2) nor the level of ICAM-1 expression by P-ECs (data not shown).

## Discussion

We demonstrated that the ICAM-1 pathway contributes to endothelial cells growth and resistance to apoptosis by stimulating the activation of some downstream effectors notably survivin, Src, p38 and ERK. Proliferation and resistance to apoptosis were higher in P-ECs from CTEPH patients than from control. This phenomenon is related to an overexpression of ICAM-1 in P-EC from CTEPH, which acts as an autocrine loop to regulate endothelial cells growth and viability. Indeed inhibition of ICAM-1 reduced significantly the P-EC growth and increased cell apoptosis.

One of the fundamental questions in CTEPH pathogenesis is how the presence of unresolved thrombi within the pulmonary arteries leads to the chronic clot and vessel fibrosis seen in the disease. Consequently, this study focuses on the pathophysiology underlying the progression from clot to fibrosis, with our hypothesis being that changes in the pulmonary artery endothelium contribute to the pathogenic vascular remodeling seen in CTEPH [7,8].

Previous *in vitro* and animal studies have suggested that the balance between EC proliferation/apoptosis is disturbed in CTEPH [9]. However, the mechanism of this imbalance remains to be elucidated. Although apoptosis is a multistage and genetically controlled process that allows normal cells turnover, it is subjected to physiologic and pathophysiologic regulation mediated by growth factors and cytokines [16]. Here we reported that this phenomenon was related to an overexpression of ICAM-1 by P-EC. ICAM-1 is a cell surface glycoprotein of 505 amino acids, member of the immunoglobulin superfamily of adhesion molecules. ICAM-1 is a multifunctional protein involved in many biological processes, including cell proliferation, adhesion and migration [18]. Hence, ICAM-1 seems to be a good candidate to explain P-EC proliferation-apoptosis imbalance in CTEPH and may contribute to pathogenic vascular remodeling.

Induction of endothelial cell gene expression represents an important consequence of ICAM-1 activation. Activation of ICAM-1 receptor, results in activation of multiple intracellular signaling pathways, including Src and ERK1/2, that are required for cell migration, proliferation and apoptosis. We studied in P-EC the role of the autocrine ICAM loop on these pathways in both controls and CTEPH endothelial cells. Under basal condition, P-EC growth and apoptosis-resistance were higher in CTEPH than in controls. This phenomenon was associated to a larger levels phosphorylated Src, p38 and ERK1/2. Inhibition of ICAM-1 synthesis or activity reduced P-EC growth and increased apoptosis. These changes were strongly related to decreased expression's levels of Src, p38 and ERK1/2 phosphorylation. In addition, ICAM-1 synthesis or activity almost completely inhibited the excessive proliferation and the constitutive ERK1/2 activation in CTEPH and abolished the difference between controls and CTEPH P-ECs.

We previously reported that the conditioned media from P-ECs contain a large amount of growth factors involved in the acquisition and maintenance of endothelial cells growth and apoptosis-resistant on PDGF, EGF, and FGF-2. In this work, we demonstrate that ICAM-1 also had a crucial role in the control of these processes and could explain the mechanism of P-EC altered phenotype in CTEPH. Until now, ICAM-1 was especially known for its role in the transmigration of leukocytes out of vascular endothelial cells and in inflammation process. This work is the first to address the role of ICAM-1 in the regulation of endothelial functions. Indeed P-ECs synthesized a large amount of ICAM-1 in particular in CTEPH groups and also its receptor LFA-1, increase of ICAM-1 production was associated to an increase of P-EC growth and apoptosis-resistance. Second ICAM-1 receptor activation increase Src phosphorylation that increases ERK activity through Raf kinase. These responses were more marked in CTEPH groups and were completely abrogated after ICAM-1 synthesis or activity inhibition.

However we cannot exclude the involvement of other growth factors, such as FGF-2 and VEGF to support EC growth and prevent EC apoptosis [5,6,16]. Beyond the cited classic growth factors, we investigated the possible contribution of ICAM-1 in P-EC synthesis of survivin, another protein involved in angiogenesis process by reducing apoptosis as well as favoring endothelial cell proliferation and migration. We found that ICAM-1 stimulated the production of survivin.

Taking together, these findings indicate that increased activity of the ICAM-1 autocrine loop induced both P-EC apoptosis-resistant phenotype and also in hyperproliferative phenotype observed in CTEPH.

The ICAM 469 E/K polymorphism was often associated to cardiovascular disease [20]. Our data suggested that the frequency of E genotype (EE and EK) was significantly higher in CTEPH when compared to controls ( $P < 0.001$ ) and were associated with an increased risk of disease development (OR= 95% CI: 1.7 to 8.5;  $P < 0.001$ ). However, in CTEPH population, we did not establish any association between allele frequencies and the hemodynamic. Moreover, there was no difference of ICAM-1 expression in endothelial cells among patients with different genotypes. These results suggest that ICAM-1 gene polymorphism, which results in the substitution of lysine to glutamate (K469E) [20], may has an influence on the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Indeed, E genotype results in higher affinity of LFA-1 to ICAM-1.

We also showed that ICAM-1 modulates the expression survivin which is a potent angiogenic factor. Survivin is generally expressed in embryonic tissues, but it is weakly expressed in most normal adult tissues, whereas it is overexpressed in the majority of human cancers. Anti-apoptosis, promoting the cell division and angiogenesis properties of survivin, is thought to provide a significant growth advantage in tumor cells. Here we observed an overexpression of survivin by P-ECs from CTEPH, which is depending of ICAM-1. Indeed protein levels fall

dramatically when the ICAM-1 signalization was inhibited. In summary, our data support the notion that the overproduction of EC-derived ICAM-1 in CTEPH contributes to multiple different components of the disease including leukocytes migration and inflammation via a paracrine effects, but here we revealed a new facet of ICAM-1 and its implication in the maintenance of a proliferative/apoptosis-resistant phenotype of P-ECs in CTEPH via an autocrine loop.

CTEPH is a complication of acute pulmonary embolism (PE) resulting from occlusion of large pulmonary arteries with a fibro-thrombotic material and the development of a distal vessel arteriopathy. Why CTEPH develops in some patients who have acute PE remains unknown [1-4]. Moreover, these results suggest that the ICAM-1 signaling pathway may represent an attractive therapeutic target to avoid CTEPH after pulmonary embolism.

## Acknowledgements

**Author Contributions:** SE had full access to all data in this study and accepts full responsibility for the integrity of the data and accuracy of the analysis. JeAA, OM, SE and EF designed the study. JeAA, PDo, LL, FL, BD, JoAA, SAA and SE performed the experiments. JeAA, OM, PDo, PDa, SE, and EF analyzed the data and prepared the manuscript. All authors approve of the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work.

**Financial/nonfinancial disclosures:** The authors report that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

**Funding:** This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009 of the French Ministry of Health; RCB 2009-A0098057.

## References

1. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004;23(4):637–648.
2. Pengo V, Lensing AWA, Prins MH, et al. Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 2004;350(22):2257–2264.
3. Tapson VF, Humbert M. Incidence and prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from acute to chronic pulmonary embolism. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(7):564–567.
4. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, et al. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH) Results From an International Prospective Registry. *Circulation* 2011;124(18):1973–1981.
5. Londy FJ, Kadell AM, Wroblewski SK, Prince MR, Strieter RM, Wakefield TW. Detection of perivenous inflammation in a rat model of venous thrombosis using MRV. *J Invest Surg Off J Acad Surg Res* 1999;12(3):151–156.
6. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, et al. Venous Thrombosis–Associated Inflammation and Attenuation With Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(2):258–268.
7. Boulate D, Perros F, Dorfmüller P, et al. Pulmonary microvascular lesions regress in reperfused chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2015;34(3):457–467.
8. Haehling S von, Bardeleben RS von, Kramm T, et al. Inflammation in right ventricular dysfunction due to thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2010;144(2):206–211.
9. Kimura H, Okada O, Tanabe N, et al. Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Pulmonary Vascular Resistance in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(2):319–324.
10. Bonderman D, Wilkens H, Wakounig S, et al. Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;33(2):325–331.
11. Quarck R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(14):1211–1218.
12. Szmítko PE. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I. *Circulation* 2003;108(16):1917–1923.
13. Zabini D, Heinemann A, Foris V, et al. Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients. *Eur Respir J* 2014;44(4):951–962.



14. Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw.* 2004 Apr-Jun;15(2):91-8.
15. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol.* 1999 Dec;66(6):876-88.
16. Dowlati A, Gray R, Sandler AB, Schiller JH, et al. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1407-12
17. Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 1997 Oct;9(5):643-50.
18. Grzelewska-Rzymowska I, Pietrzakowicz M. Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation]. *Pol Merkur Lekarski.* 2004 Feb;16(92):179-82.
19. Ishibashi M, Miyanaga Y, Matsuoka S, et al. Integrin LFA-1 regulates cell adhesion via transient clutch formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 21;464(2):459-66.
20. Tabatabai E, Salimi S, Mohammadoo-Khorasani M, et al. KE and EE genotypes of ICAM-1 gene K469E polymorphism is associated with severe preeclampsia. *Dis Markers.* 2014;2014:124941.

**Table1. Genotypic distribution of ICAM-1 gene polymorphism in CTEPH patients and control population**

|                         | <b>Controls</b> | <b>CTEPH</b> | <b><i>P</i></b> |
|-------------------------|-----------------|--------------|-----------------|
| <b>Patients, n</b>      | 119             | 172          | <i>NS</i>       |
| <b>Age (years)</b>      | 64 ± 9          | 61 ± 11      | <i>NS</i>       |
| <b>Sex, female/male</b> | 31/88           | 82/90        |                 |
| <b>Genotype KK</b>      | 58 (48,73%)     | 47 (27,48%)  | <i>NS</i>       |
| <b>Genotype KE+EE</b>   | 61 (51,26%)     | 125 (73,09%) | <i>P</i> <0.001 |

**Table 2. Comparison of characteristic of all patients with CTEPH based on ICAM genotypes**

|   | <b>All</b>  | <b>KK</b>   | <b>KE+EE</b> |
|---|-------------|-------------|--------------|
| <b>Patients, n</b>                            | 172         | 47 (27,48%) | 125 (73,09%) |
| <b>Age (years)</b>                            | 61 ± 11     | 60 ± 11     | 60 ± 11      |
| <b>Sex, female/male</b>                       | 82/90       | 21/26       | 61/125       |
| <b>Mean PAP,mmHg</b>                          | 45,0 ± 11,1 | 46,6 ± 13,2 | 44,59 ± 10,2 |
| <b>Total pulmonary resistance,W.U</b>         | 10,4 ± 4,5  | 10,4 ± 3,9  | 10,4 ± 4,6   |
| <b>Cardiac output, L·min<sup>-1</sup></b>     | 4,6 ± 1,1   | 4,5 ± 1,0   | 4,6 ± 1,1    |
| <b>Cardiac index, L/min/m<sup>2</sup></b>     | 2,5 ± 0,5   | 2,4 ± 0,5   | 2,5 ± 0,4    |
| <b>History thromboembolic disease ,yes/no</b> | 140/31      | 33/10       | 67/58        |
| <b>Clotting diagnosis,yes/no</b>              | 28/143      | 4/43        | 25/100       |
| <b>Jamieson classification I</b>              | 18/172      | 6/47        | 13/125       |
| <b>Jamieson classification II</b>             | 111/172     | 33/47       | 79/125       |
| <b>Jamieson classification III</b>            | 30/172      | 5/47        | 24/125       |
| <b>Jamieson classification IV</b>             | 6/172       | 3/47        | 3/125        |

## Figures Legends

**Figure 1.** Double labeling with ICAM-1 and either CD31 or  $\alpha$ -actin were used to investigate its localization in the section of pulmonary endarterectomy specimens from CTEPH patients. We found a strong ICAM-1 immunoreactivity in endothelial cells, in contrast no immunostaining is detected in smooth muscle cells. No immunoreactivity is detected in section incubated with secondary antibody, but no primary Antibody. Scale bar : 100  $\mu$ m

**Figure 2.** ICAM-1 and its receptor LFA1 mRNA levels assessed by real-time quantitative PCR in P-ECs obtained from CTEPH or from controls. Values are mean  $\pm$  SEM from 20 controls and 20 patients with CTEPH. \*\* $p < 0.01$  are compared with values obtained in controls.

**Figure 3.** ICAM-1 and its receptor LFA-1 expression in cultured P-ECs obtained from CTEPH or from controls (n=10 in each group). **Left panel** : Immunofluorescence analysis demonstrating the expression and localization of ICAM-1 or of LFA-1 (**A**) and CD31 (**B**) in P-ECs isolated from patients with CTEPH and from control subjects. No immunoreactivity is detected in cells incubated with secondary antibody, but no primary Antibody. Scale bar : 100  $\mu$ m. **Right panel** : ICAM-1 and its receptor immunoreactivity (**A**) detected in endothelial cells from controls and from CTEPH patients and quantification (**B**) in the signal in each group by Western blot. Each bar is the mean  $\pm$  OD (arbitrary units) at the signal in cells from 10 patients and 10 controls. \*\* $p < 0.01$  are compared with values obtained in controls.

**Figure 4.** In vitro proliferation and apoptosis analysis of human P-ECs isolated from CTEPH and from controls. Proliferation P-ECs was assessed by (A) 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation under basal conditions and in the presence of FCS. Apoptosis was estimated by

quantification of nuclear positive cells under basal conditions and after serum deprivation during 24h using a TUNEL-based in situ cell death detection assay. The P-ECs growth and apoptosis analysis were performed also in the presence of increasing concentrations of I1 and I2. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 compared with control P-ECs under basal conditions. †P < 0.05, ††P < 0.01, and †††P < 0.001 between control and CTEPH P-ECs subjected to the same treatment (n=7 in each group).

**Figure 5. Left panel:** Immunofluorescence (left panel) and **Right panel:** immunoblotting analysis of ICAM-1 effectors expression and activation : Src (A), p38 (B), ERK (C) and survivin (D). The phosphorylated and total Src, p38, ERK also survivin protein levels were estimated in P-ECs from CTEPH patients and control subjects incubated with 5%FCS in the presence of ICAM-1 synthesis or activity inhibitors (I1 and I2) at increasing concentrations. Each bar is the means  $\pm$  SEM in protein extracts from six patients and six control subjects. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.001 compared with control P-ECs under basal conditions. †P < 0.05, ††P < 0.01, and †††P < 0.001 between control and CTEPH P-ECs subjected to the same treatment.control subjects.

Figure 1

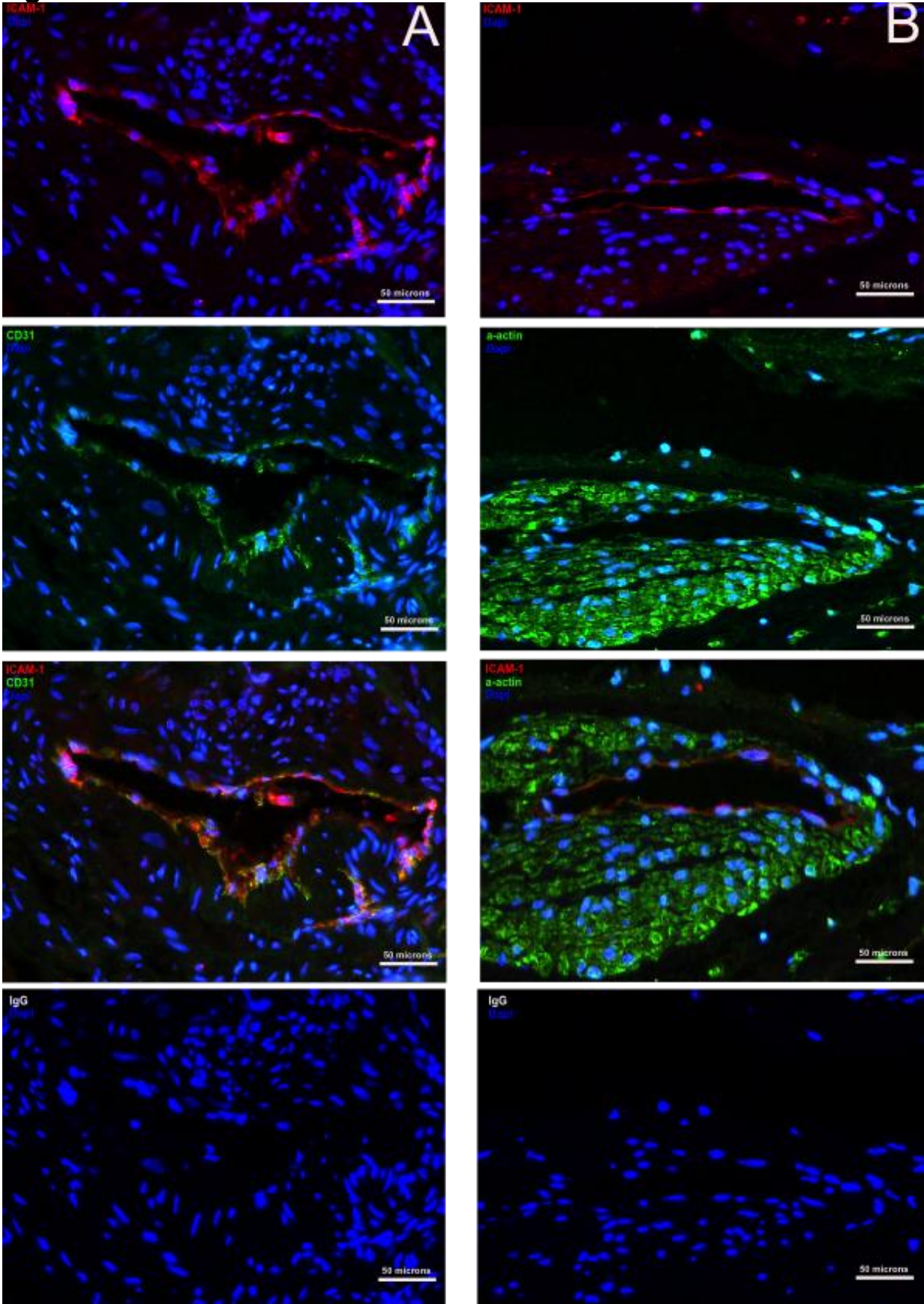
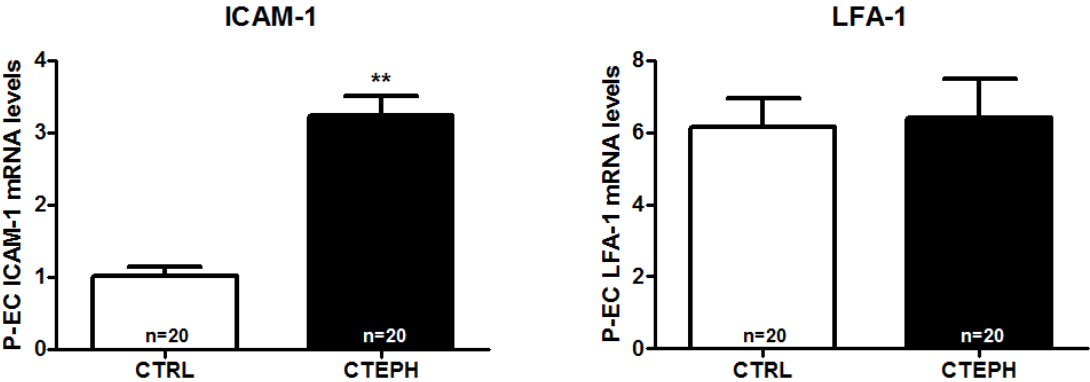


Figure 2



**Figure 3**

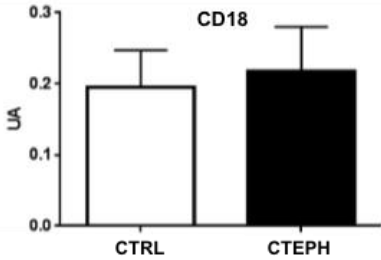
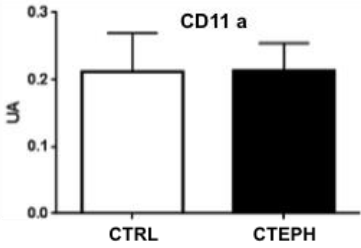
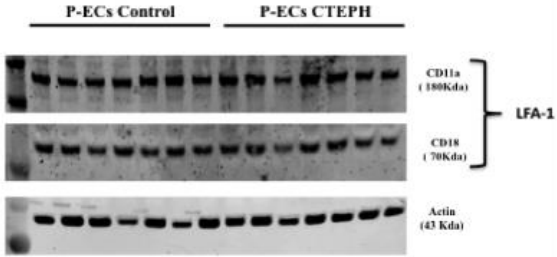
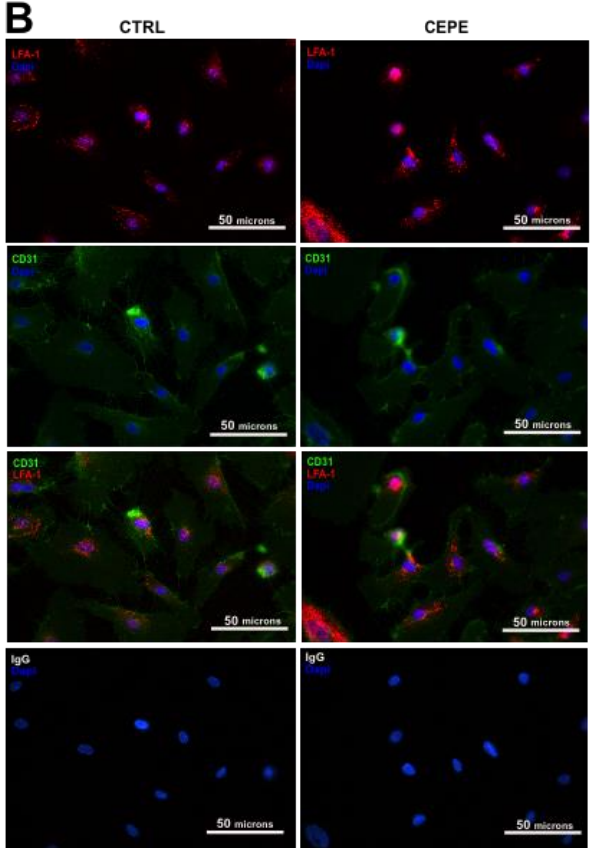
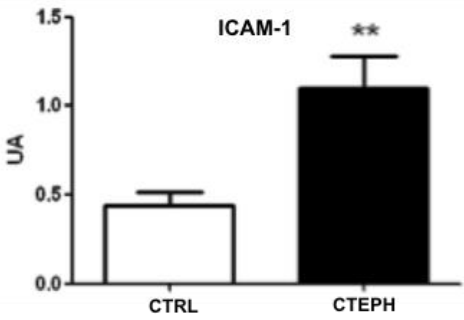
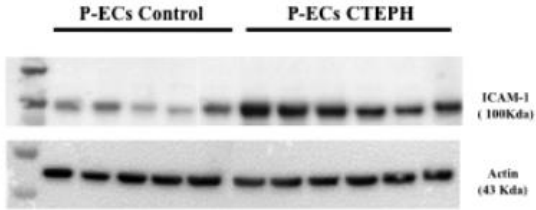
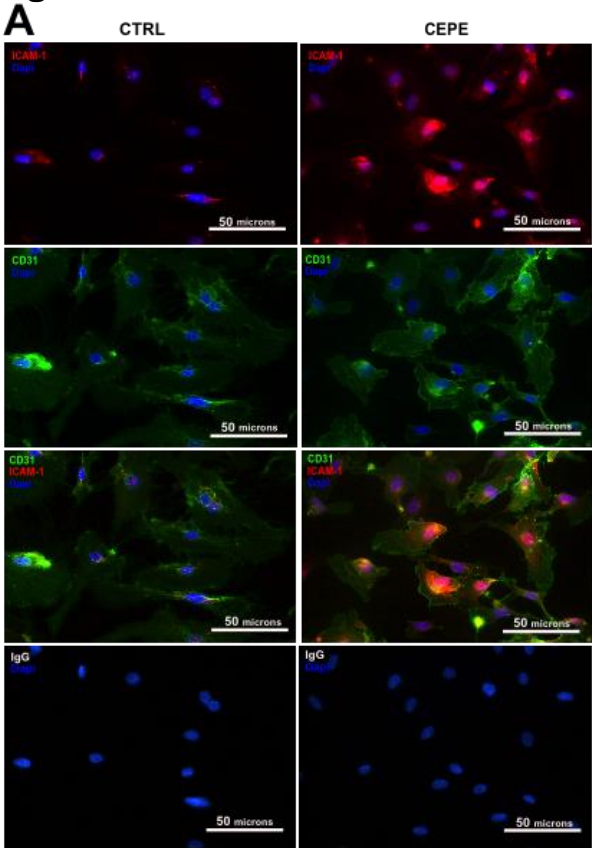
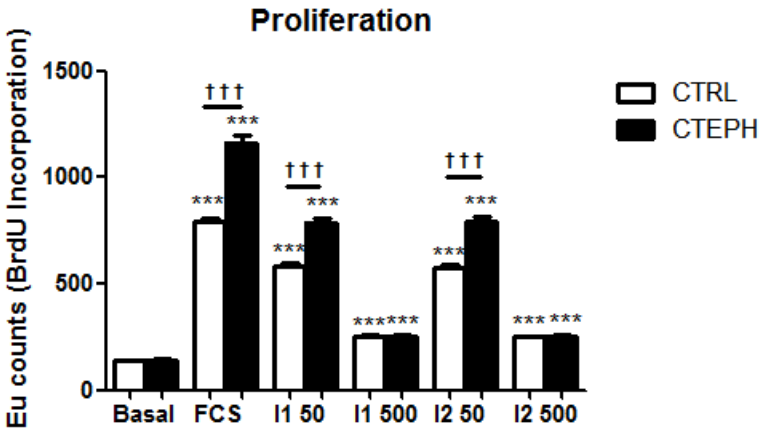
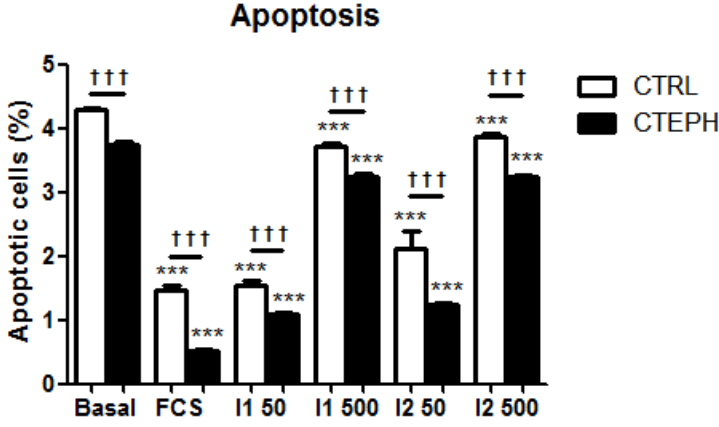


Figure 4

A

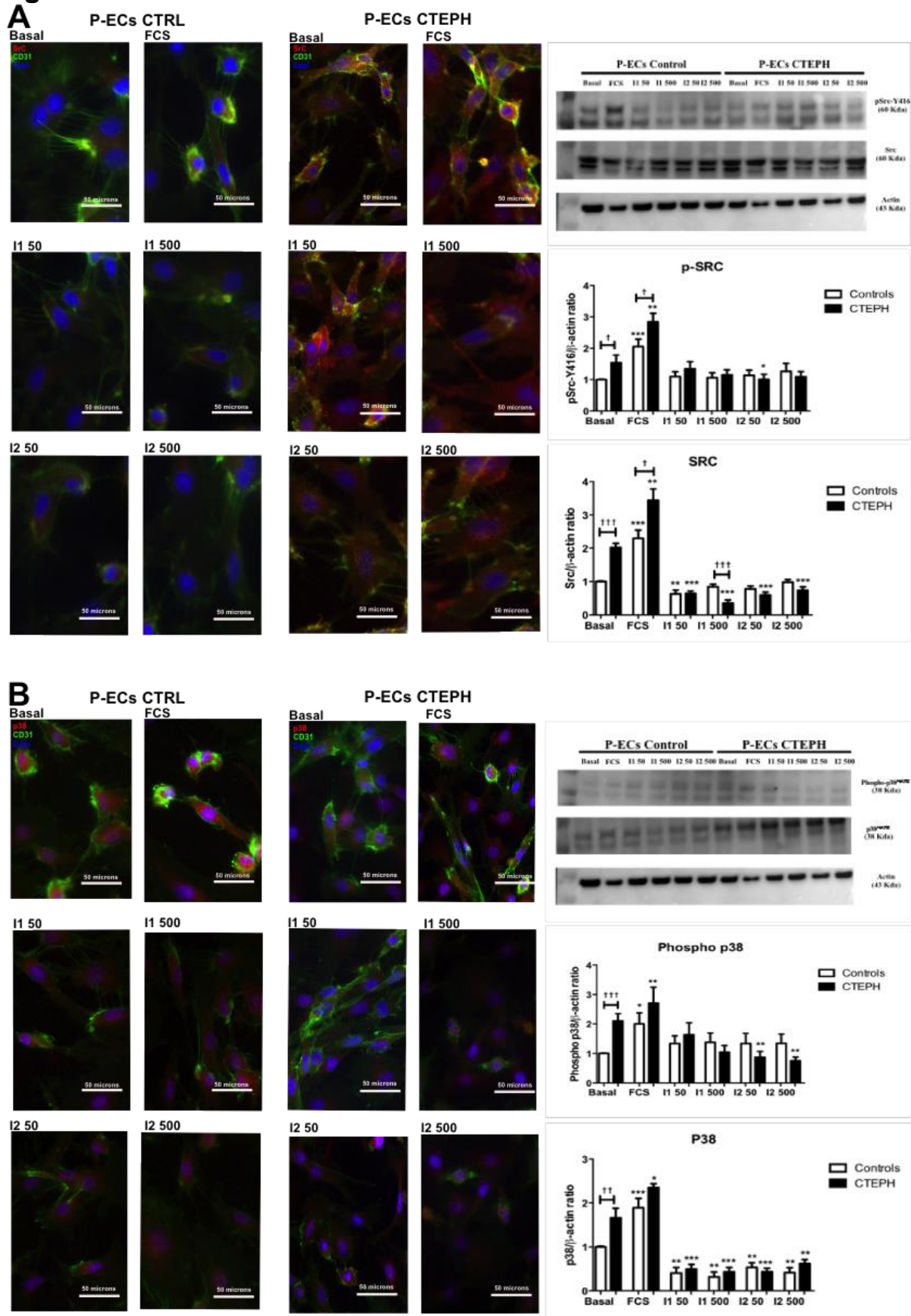


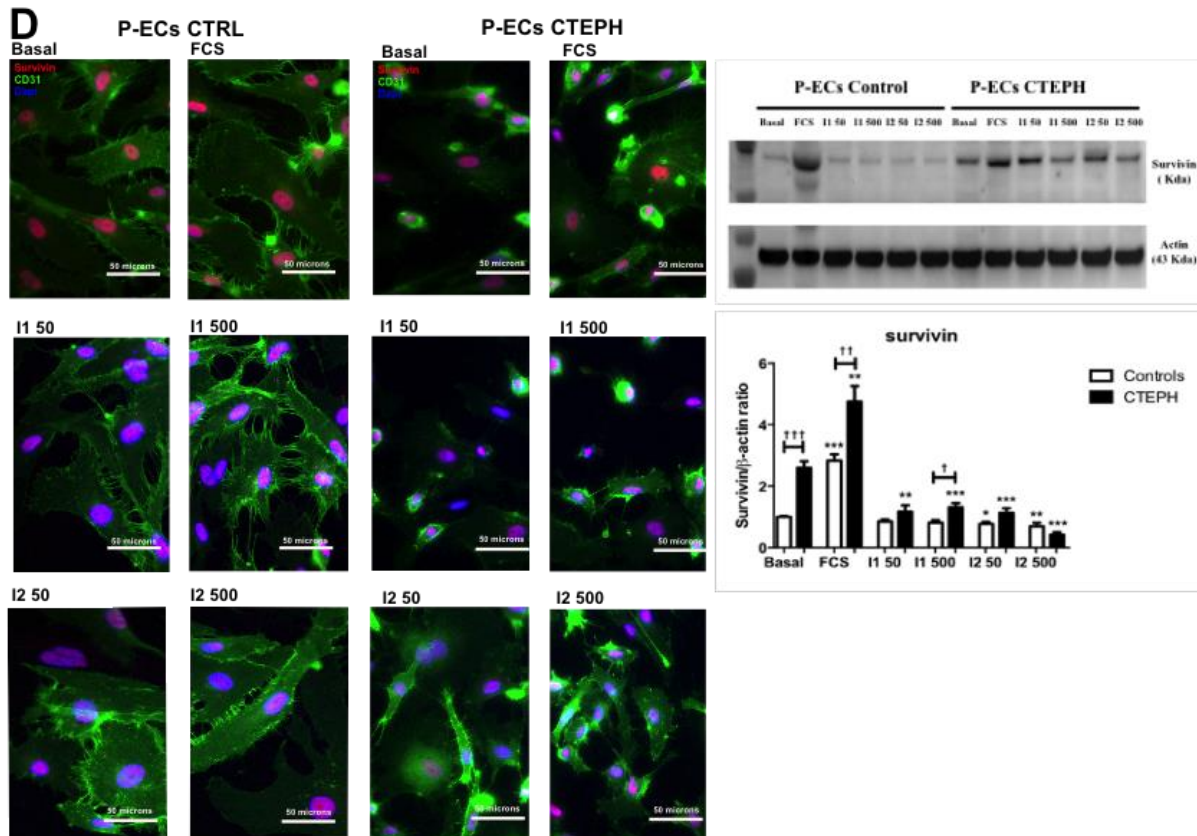
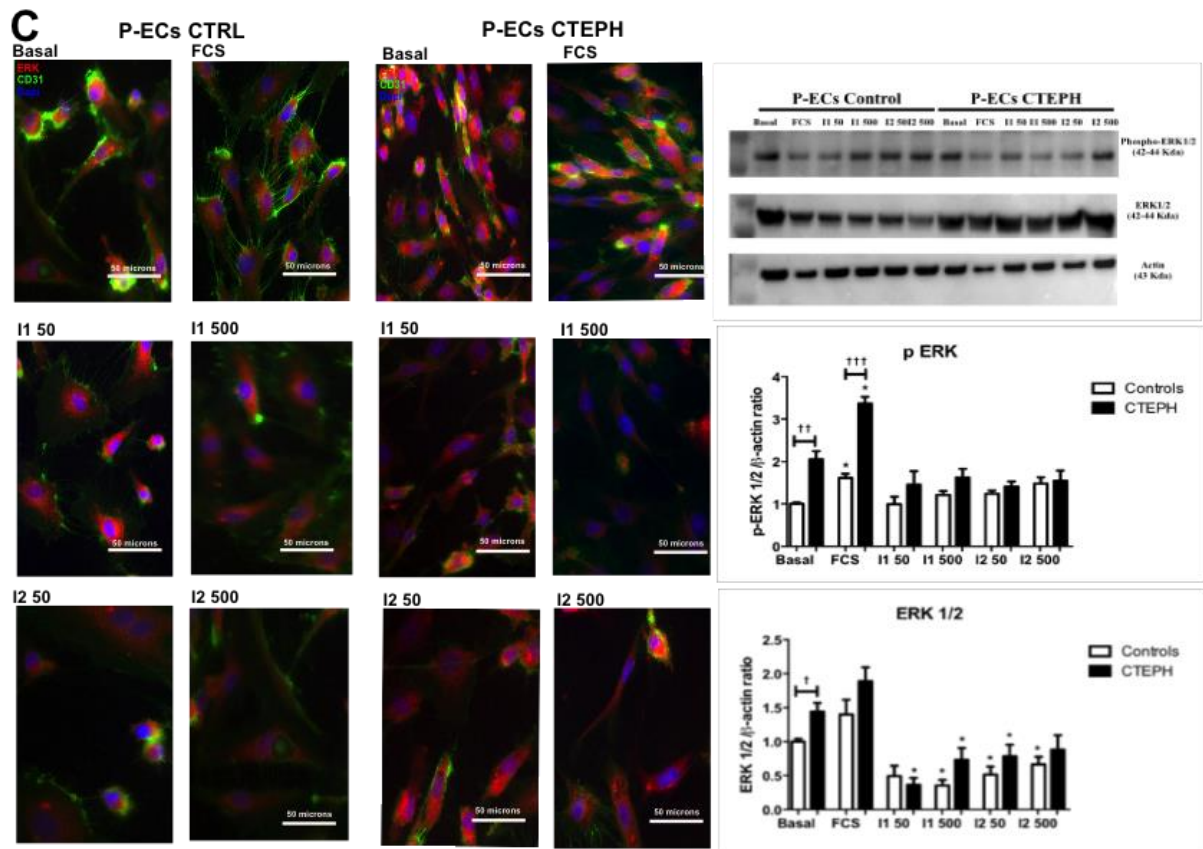
B





**Figure 5**





## **Etude 3: « *Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Role of Endothelial Fibroblast Growth Factor-2 In The Unresolved fibrotic Thrombus vascularization* »**

**Travail en préparation**

### ***Introduction***

L'HPPE résulte d'une obstruction du lit vasculaire pulmonaire par une absence de résolution de séquestre. Les mécanismes pathogènes impliqués dans le développement de l'HPPE sont encore peu décrits. Nos travaux antérieurs démontrent le rôle clé de la dysfonction endothéliale pulmonaire dans l'organisation et le maintien du séquestre. En effet, une altération du phénotype de la cellule endothéliale pulmonaire semble être étroitement associée au développement de l'HPPE. Nous avons également montré que les cellules endothéliales pulmonaires libèrent une grande quantité d'un facteur angiogénique puissant, le FGF-2. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) est un facteur de croissance ubiquitaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la survie cellulaire, la prolifération, la migration, la croissance et la différenciation. De nombreuses études ont démontré que le FGF-2 semble jouer un rôle important dans le développement de l'HTAP. Toutefois, le rôle de FGF-2 dans le développement et la progression de l'HPPE n'a jamais été décrit.

### ***Hypothèse***

Dans ce travail, nous avons supposé que FGF-2 étant surexprimé par les cellules endothéliales de patients HPPE joue un rôle clé dans la vascularisation du séquestre. Nous pensons que FGF-2 est séquestré dans la matrice extracellulaire (fibrine et collagène) et est impliqué dans le processus angiogénique. L'effet du FGF-2 sur la revascularisation du séquestre est médiée par le recrutement de progéniteurs endothéliaux.

### ***Résultats et discussion***

Dans cette étude, nous avons montré que la non-résolution du séquestre est associée à une néo-vascularisation de ce tissu. Ce phénomène implique le recrutement de progéniteurs endothéliaux et leur différenciation en cellules endothéliales. Par immunohistochimie, nous avons montré la présence en grand nombre de cellules CD34 positives. Nous avons voulu quantifier

dans le séquestre l'expression de facteurs angiogéniques. FGF-2 est hautement présent dans le séquestre de patients HPPE. On retrouve également une expression accrue de l'angiopoïétine 1 et 2. SDF-1, facteur sécrété par les progéniteurs endothéliaux, est également bien présent dans le séquestre. Par contre, on ne retrouve que très peu de VEGF (facteur angiogénique le plus connu). La cellule endothéliale est au centre de la pathogénèse de l'HPPE. Nous avons voulu voir quels facteurs angiogéniques étaient sécrétés anormalement par la CE dans l'HPPE. FGF-2 est hautement synthétisée par les cellules endothéliales. Nous avons voulu vérifier que cette surexpression est également présente à l'échelle génique. Par qPCR, nous avons vu que FGF-2 est surexprimé dans les CE dans l'HPPE ainsi que ces récepteurs.

A ce niveau, nous sommes sûrs de l'expression anormale de FGF-2 observé dans la CE dans l'HPPE. Toutefois, nous avons voulu voir le rôle de FGF-2 dans l'angiogénèse de l'HPPE. Par la technique de matrigel, nous avons observé que FGF-2 possède un rôle essentiel dans la formation de tubules dans les CE dans l'HPPE. Quand FGF-2 est inhibé, on ne retrouve plus cette formation de tubules.

### ***Conclusion***

Cette étude nous a permis de mettre en évidence le rôle essentiel que joue FGF-2 dans la néo-vascularisation observée dans les séquestres de patients souffrant d'HPPE.

# **Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension : Role of Endothelial Fibroblast Growth Factor-2 In The Unresolved Fibrotic Thrombus vascularization**

**Running Head:** Pulmonary Endothelial Cells & CTEPH Pathogenesis

**Authors:** Jennifer Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Olaf Mercier, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Lilia Lamrani, MSc<sup>1</sup>, Stephanie Arthur Ataam, MSc<sup>1</sup>, Peter Dorfmueller, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Joanna Arthur Ataam, MSc<sup>4</sup>, Florence Lecerf<sup>1</sup>, Benoit Decante, MSc<sup>1</sup>, Philippe Dartevelle, MD<sup>1,2</sup>, Elie Fadel, MD, PhD<sup>1,2</sup>, Saadia Eddahibi, PhD<sup>1,4</sup>

## **Academic Affiliations:**

<sup>1</sup> Research and Innovation Unit, INSERM U999, DHU TORINO, Paris Sud University, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>3</sup> Department of Pathology, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

<sup>4</sup> INSERM U1046, CNRS UMR 9214, Université de Montpellier, CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier, France

## **Corresponding Author:**

Saadia EDDAHIBI, PhD  
INSERM U1046, CNRS UMR 9214  
Université de Montpellier,  
CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier,  
371 Avenue du Doyen Gaston Giraud  
34295, Montpellier, France  
email: saadia.eddahibi@inserm.fr

**Conflicts of Interest:** All authors state that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article

**Funding:** This work was funded by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2009 of the French Ministry of Health; RCB 2009-A0098057.

## **Abbreviations**

CTEPH – Chronic thromboembolic pulmonary hypertension

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

EGF – Epidermal growth factor

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

FCS – Fetal calf serum

FGF-2 – Fibroblast growth factor-2

ECM – ExtraCellular Matrix

VEGF– Vascular Endothelial Growth Factor

FGFR– Fibroblast growth factor Receptor

PAH – Pulmonary arterial hypertension

PBS – Phosphate buffered saline

PASMC – Pulmonary artery smooth muscle cells

PEA – Pulmonary endarterectomy

PEC – Pulmonary artery endothelial cells

## **Abstract**

**Rationale :** Pulmonary endothelial cell (P-EC) plays a key role in the organization and the non-resorption of thrombus in Chronic ThromboEmbolic Pulmonary Hypertension (CTEPH). Several groups develop a vasculogenesis in endarterectomized tissue of CTEPH patients. We recently demonstrated that pulmonary endothelial cells released a large amount of a potent angiogenic factor FGF-2. FGF-2 is a ubiquitous growth factor implicated in many physiological and pathological processes, such as cell survival, proliferation, migration, growth and differentiation.

**Objectives :** In this work we hypothesized that FGF-2 overexpressed by endothelial cells in CTEPH plays a key role in the thrombus vascularization. We want to see if the angiogenic process involved free FGF-2 or sequestered FGF-2 in ECM (fibrin and collagen) and the effect of FGF-2 on thrombus vascularization mediated by endothelial progenitors cells recruitment.

**Methods & Results:** CTEPH thrombus remodeling is associated with a large amount of collagen and fibrin accumulation. Also, we identified various cell types including monocytes, fibroblasts, smooth muscle and endothelial cells. Moreover a neovascularization take place in the thrombus. The new vessels wall is composed by both mature and endothelial progenitor cells. This observation suggests that the thrombus vascularization is related to a recruitment and maturation of resident endothelial progenitor cells. The CTEPH tissue contains high levels of FGF-2 and a weak concentration of VEGF. We also looked of the origin of FGF-2 and we demonstrated that endothelial cells predominantly synthesize FGF-2. Using the Matrigel technique we conclude that tube formation was more pronounced in ECs from

CTEPH than controls. This effect involved FGF-2 pathways and was abolished in response to FGFR1 antagonist. Thus suggests that the neovascularization of thrombus in CTEPH involved FGF-2 with autocrine loop manner.

**Conclusion:** We demonstrated clearly that FGF-2 plays a key role in the neovascularization of thrombus tissues.



## Introduction

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) results from obstruction of the pulmonary vascular bed by non-resolving thromboemboli [1]. Although anatomic resolution of acute embolism is often incomplete, sufficient resolution occurs in the majority of patients to restore normal pulmonary haemodynamics associated with return to a pre-embolism functional status [2]. Several prospective studies have reported that between 0.6 and 4.6 % of patients with acute pulmonary emboli will develop symptomatic CTEPH [3, 4].

The pathophysiology of CTEPH remains unclear. The disease represents the consequences of thrombus resolution failure after the establishment of thrombosis within the elastic pulmonary arteries. Thrombotic material becomes fibrosed, with occlusive vascular remodeling and the development of pulmonary hypertension and right ventricular heart failure [5, 6]. However the pathogenic mechanisms for the development of CTEPH are still unclear.

Our previous works demonstrate the key role of pulmonary endothelial cells dysfunction to promote the organization and non-resorption of fresh pulmonary embolism. Indeed an alteration of pulmonary endothelial cell phenotype seems to be closely associated to development of CTEPH. Moreover several groups develop a vasculogenesis in endarterectomized tissue of CTEPH patients. Recently, we demonstrated that pulmonary endothelial cells released a large amount of a potent angiogenic factor FGF-2.

FGF-2 is the prototype member of a family of heparin-binding proteins with growth factor or hormone activity [7-9]. Formerly known as basic FGF (bFGF), FGF-2 is a ubiquitous growth factor implicated in many physiological and pathological processes, such as cell survival, proliferation, migration, growth and differentiation [9]. The biological effects of FGF-2 are mediated by four high-affinity tyrosine kinase receptors (FGFR-1 to -4) and low-affinity receptors, consisting of the heparan sulfate (HS) and heparan sulfate proteoglycans (HSPG) present in the extracellular matrix (ECM) or bound to the membrane of essentially all cell

types. FGF-2 binding of HSPG provides a fine control of the bioavailability and interaction of this growth factor with cells [10]. Cell-associated HSPG are required for FGF-2 binding, and FGFRs activation, which involves the dimerization of a ternary complex consisting of two molecules of FGF-2, two FGFRs and two heparan sulfate chains [10, 11]. HSPG on the cell membrane and in the ECM also act as a high-capacity reservoir for FGF-2. By virtue of its binding to HSPG, FGF-2 is highly concentrated in insoluble phase on the cell surface and ECM, and can thus provide prolonged stimulation to the cell [12, 13]. ECM-degrading proteinases including plasminogen activators/plasmin and MMPs have been implicated in the mobilization of FGF-2 from the insoluble phase, necessary for FGFR activation [13, 14]. Numerous studies have demonstrated that fibroblast growth factor-2 (FGF-2) signaling may play a pivotal role in the development of pulmonary arterial hypertension (PAH). Excessive endothelial FGF-2 contributes to endothelial cells growth and apoptosis resistance in idiopathic pulmonary hypertension. Despite the overproduction of FGF2 by pulmonary endothelial cells in CTEPH, its role in the development and the progression of the disease remains unclear.

In this work we hypothesized that (i) FGF-2 overexpressed by endothelial cells in CTEPH plays a key role in the thrombus vascularization (ii) the angiogenic process involved the free FGF-2 but essentially sequestered FGF-2 in ECM (fibrin and collagen) is highly present in the thrombus; (iii) the effect of FGF-2 on thrombus vascularization is mediated by endothelial progenitors cells recruitment.

# **Material and methods**

## **Study population**

This study was conducted in accordance with the amended Declaration of Helsinki and approved by the institutional review board of Marie Lannelongue Hospital. Written, informed consent was obtained from all patients. PEA specimens from CTEPH patients (n=183), and pulmonary artery specimens from control patients (n=20) undergoing lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer, were collected. Pulmonary arteries were harvested as far as possible from the tumor. Preoperative transthoracic echocardiography confirmed the absence of pulmonary hypertension (right ventricular systolic pressure less than 30 mmHg) in all control patients. The clinical characteristics of both groups are summarized in Table 1.

## **Immunofluorescence and Histochemical Staining**

Paraffin-embedded sections (5µm thick) of pulmonary endarterectomy specimens were mounted on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, France). Slides were de-waxed in 100% toluene and rehydrated by immersion in decreasing ethanol concentrations (100%, 95%, and 70%) followed by distilled water. After blocking with phosphate buffered saline containing 1% (weight/volume) bovine serum albumin (BSA) and 0.1% (volume/volume) Tween 20, the sections were incubated at 4°C overnight with either an anti-human CD31 antibody to detect endothelial cells (1/50, DAKO), an anti-human CD34 antibody to detect endothelial progenitors cells (1/50, Abcam), an anti-human CD117 antibody to detect endothelial progenitors cells (1/50, Abcam), an anti-human  $\alpha$ -actin antibody to detect smooth muscle cells (1/250, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or an anti-human CD68 antibody to detect macrophages (1/200, ABD Serotec, France). Fluorescein-conjugated IgG (Vector Laboratories, Inc.) was used as the secondary antibody. Nuclear counterstaining using 4', 6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) was performed according to the

manufacturer's recommendations. Finally, the sections were stained with hematoxylin and eosin. Qualitative and quantitative measurement of collagen matrix accumulation was assessed with collagen-specific Masson's trichrome staining. The ratio of organized versus unorganized thrombus was measured in 100 samples (same patients included in ELISA studies).

### **Isolation and Culture of Human P-ECs**

Human Pulmonary Endothelial Cells (hPECs) controls were obtained by Dispase I 1 mg/mL and collagenase 1 mg/mL digestion (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) of a fragment left pulmonary artery at 37°C for 2 hours. Proximal PECs of CTEPH patients were isolated using enzymatic digestion. The suspension was filtered, plated onto 0.1% gelatin-coated wells, and grown in MCDB131 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 4 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L HEPES, 10 U/mL heparin, 1 µg/mL human endothelial cell growth supplement, and 20 ng/mL vascular endothelial growth factor (Promocell, Heidelberg, Germany). Immunomagnetic purification of PECs was then performed with anti-PECAM-1 (CD31) monoclonal antibody-labeled DynaBeads (Dyna, Biotech, Compiègne, France). For endothelial-cell phenotype characterization, the cells were labeled with acetylated low-density lipoprotein (LDL) coupled to a fluorescent carbocyanine dye (DiI-Ac-LDL, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) and stained with antibodies against the endothelial cell-specific lectin *Ulex europaeus* agglutinin-1 (UEA-1, Sigma, Lyon, France). Experiments were also performed using monoclonal antibodies against desmin and vimentin (Dako, Trappes, France). Cells positive for DiI-Ac-LDL, UEA-1, CD31 and vWF and negative for desmin and vimentin were classified as endothelial cells and constituted >95% of our PEC cultures. Cells were used for the study between passages 3 and 6.

### **Enzyme-linked immunosorbent assay.**

PEA specimen supernatant from CTEPH patients were used for this experiment. In brief, 100 mg of PEA specimen supernatant was collected from 40 PEA specimen lysis. ANG-1, ANG-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, SDF-1 and FGF-2 were measured in the supernatant using ELISAs (R&D Systems).

### **P-EC Medium Effects**

The levels of angiogenic factors (ANG-1, ANG-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, SDF-1 and FGF-2) in the PEC medium were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as per the manufacturer's instructions.

PEC were seeded in 24-well plates containing MCDB131 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well and allowed to adhere and grow for 24 hours. These cells were then cultured in growth factor-free MCDB131 medium for 24 hours, after which the medium was collected and used as PEC medium.

### **Quantitative determination of angiogenic factor and their receptors mRNA levels.**

ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-R1, VEGF-R2, SDF-1, FGF-2, FGF-R1 and FGF-R2 expression was examined in P-ECs from CTEPH patients and from controls. Total RNA was extracted using phenol chloroform method and its concentration was determined using standard spectrophotometric techniques. Then, mRNA levels were estimated by qRT-PCR. First, reverse transcription was performed using Quantitect reverse transcription (Qiagen). For PCR, we used Taqman primer for ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-R1, VEGF-R2, SDF-1, FGF-2, FGF-R1 and FGF-R2 (Applied Biosystems). To avoid inappropriate amplification of residual genomic DNA, intron-spanning primers were selected and internal control 18S rRNA primers (Applied Biosystems). For each sample, the amplification reaction was performed in duplicate using Taqman Master Mix

(Applied Biosystems) and specific primers. Signal detection and result analysis were achieved using Step one plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Expression of the gene of interest was computed relative to the expression of the internal standard r18S using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### **Tube formation assays**

For tube formation assays, 24-well plates were coated with 10 mg/mL with Matrigel in each well and incubated for 1 h at 37°C to allow the gel to solidify. Next,  $2 \times 10^5$  control or CTEPH P-ECs were seeded in base culture medium and subjected to 18 hours of treatment. We tested the effect of FCS (10%), exogenous FGF-2 (10 ng/ml, Promocell), ANG-1 (10 ng/ml), ANG-2 (10 ng/ml), SU5402 (FGFR1 inhibitor, Tocris), FIIN1 (FGFR inhibitor, Tocris), XL184 (VEGFR inhibitor, Tocris), Tie 2 kinase and cross talk on endothelial cells formation tube. After 18 h of incubation, the cells were treated with Corning Calcein AM solution at 8  $\mu$ g/mL for 30 min. Cells were visualized using epifluorescence microscopy (Nikon fluorescence microscope). Each well was photographed (3 random images).

### **Statistics Analysis**

Continuous data are reported as mean  $\pm$  standard deviation or standard error of the mean, as appropriate. Categorical variables are presented as number and percentage. Groups were compared using the Student's t-test for continuous variables and Pearson Chi-Square or Fisher's Exact Test for categorical variables. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

## **Results**

### **Pulmonary endarterectomy specimen composition, structure and presence of progenitor endothelial cells**

The ratio of fibrous (organized thrombus) to fibrinous (unorganized thrombus), areas was 74:26 percent (Left A and B). This ratio is the most observed aspect in CTEPH thrombus. Organized thrombus typically contained fibroblasts/myofibroblasts, inflammatory cells (mainly lymphocytes and macrophages) and endothelial cells constituting numerous neo-vessels of varying size (repermeabilization vessels, black arrows in Figure 1A Left and Right).

We analyzed ECs phenotype of multiple immunofluorescence labeling against specific progenitors endothelial cells markers (CD34, CD31 and CD117) in thrombi of 20 CTEPH patients at different ages (organization).

In CTEPH patients' specimen, we observed several thin layers of ECs expressing CD34, CD31 and CD117. We also observed layer of cells expressing or coexpressing diffuse endothelial markers (CD34/CD117 or CD31/CD117) in organized thrombus (Figure 1B, C, D).

Immunofluorescence performed with appropriate species and immunoglobulin isotype control of irrelevant specificity did not lead to a detectable and relevant pattern of staining.

### **Angiogenic factors expression pattern in CTEPH thrombus**

To quantify angiogenesis in CTEPH thrombus (n=40), we measured the protein levels of ANG-1, ANG-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, SDF-1 and FGF-2 (Figure 2). We found a high expression of FGF-2 in CTEPH thrombus. ANG-1, ANG-2 and SDF-1 levels were also

high. Interestingly, we found very low VEGFA, VEGF-C and VEGF-D levels in thrombus of CTEPH patients.

### **Angiogenic factors production by CTEPH-PEC**

When compared to control PEC culture media from (n=20 in each group), CTEPH-PEC culture media contained significantly increased levels of known angiogenic factors. Specifically, levels of ANG-1 and ANG-2 were significantly decreased in the CTEPH-PEC media compared to controls  $p<0.05$  and  $p<0.01$  respectively (Figure 3A). Levels of VEGF-C and VEGF-D were significantly increased in CTEPH-PEC media  $p<0.05$  (Figure 3B). There was no difference in the level of VEGF-A (Figure 3B). FGF-2 was significantly elevated in the media from CTEPH-PEC when compared to controls  $p<0.001$  (Figure 3C). However, SDF-1 was not detected in CTEPH and control PEC media (Data not shown).

### **mRNA angiogenic factors pattern in CTEPH-PEC**

We found a significant loss of mRNA expression of various angiogenic genes ANG-1, ANG-2 in CTEPH PECs compared to controls  $p<0.05$  and  $p<0.001$  respectively but we did not found any difference with its receptor TIE-2 (Figure 4A). We observed a decrease of VEGF-A  $p<0.05$  but no difference for VEGF-B, VEGF-C even in its receptor VEGF-R2. However, VEGF-R1 was significantly increased in CTEPH patients  $p<0.05$  (Figure 4B).

Last, we confirmed FGF-2 overexpression  $p<0,001$  and its receptor FGF-R2 in CTEPH-PECs  $p<0.01$  and FGF-R1 seems to increase but not significantly (Figure 4D).

### **FGF-2 promotes endothelial tube formation with CTEPH PEC**

To determine the FGF-2 potential modulator role of in the angiogenesis of CTEPH, we used the Matrigel technique. First, we observed that CTEPH-PECs induce more tube formation



than PEC control in basal condition or with 10% of FCS. To see if FGF-2 is involved in CTEPH angiogenesis, the cells were treated with FCS or exogenous FGF-2 or SU5402 (FGFR1 inhibitor) or FIIN1 (FGFR inhibitor). We can see that FGF-2 enhanced endothelial cell tube formation but when we block FGFR-1 (SU5402) the tube formation is blocked too. When we block all FGF receptors, the tube formation is reduced but not stopped (Figure 5A). To see FGF-2 role of in the angiogenesis is specific, we treated the cells with other angiogenic factors or inhibitors of the angiogenic pathways. The blockade of VEGF receptor did not show tube formation but we can see fewer cells (Figure 5B). When the cells were treated with ANG-1 and ANG-2, we can see tube formation but not as many as in FGF-2. When the TIE 2 is blocked we can see a decrease of tube formation (Figure 5C). When Control-PECs were incubated with CTEPH-PEC media we can see an increase of tube formation. When CTEPH-PECs were incubated with Control-PECs media we did not see a difference of tube formation (Figure 5D).

## Discussion

In this study we demonstrated that, in CTEPH, the non-resolution of thrombus is associated to a neovascularization of this tissue. This phenomenon involved the recruitment of endothelial progenitor's cell and their differentiation to endothelial cells. This process involved high concentrations of FGF-2 synthesized by endothelial cells and stored in the thrombus tissue by interacting with ECM. Indeed, the formation of tubule from cultured cells was more marked in ECs from CTEPH as compared to controls. The in vitro angiogenesis is mediated by both FGFR1 and FGFR2.

Here, we examined the histological characteristics and cellular compositions of the unresolved thromboemboli. The data are consistent with previous studies reported the thrombus remodeling is associated with a large amount of collagen and fibrin accumulation. Also, we identified various cell types including monocytes, fibroblasts, smooth muscle and endothelial cells. The thrombus organization and the ratio fibrin/collagen is different according the zone studied and the thrombus ages. Moreover a neovascularization take place in the thrombus. The new vessels wall is composed by both mature and endothelial progenitor cells. Indeed the immunostaining revealed the presence of both CD31 and/or CD34, CD117 positive cells. This observation suggests that the thrombus vascularization is related to a recruitment and maturation of resident endothelial progenitor cells. This process of neovascularization, which is the *de novo* formation of endothelial cells from cell precursors. This is distinct from the angiogenesis process, a physiological process through which new blood vessels are formed from pre-existing vessels. The molecular regulation of these distinct mechanisms is largely discussed in respect to the most important positive regulators, essentially VEGF and FGF-2. To investigate the role of each pathway in the thrombus vascularization, we measured the proteins levels of these angiogenic factors in the pulmonary

endarterectomy specimens from patients with CTEPH. As shown in results section, the tissue contains high levels of FGF-2 and a weak concentration of VEGF. We also looked of the origin of FGF-2 and we demonstrated that endothelial cells predominantly synthesize FGF-2. Indeed as compared to endothelial cells isolated from control subjects, the FGF-2 derived from CTEPH endothelial cells was three fold higher. That suggesting that FGF-2 derived from endothelial cell may mediate vascularization with both autocrine and paracrine mode of action. The FGF-2 has a direct effect on several cell functions required for vascularization, including endothelial cells proliferation, migration and tubule formation. Vasculogenesis is a vital process for normal tissue development and wound healing, but is also associated with a variety of pathological conditions. Using Matrigel protocol, this process may be measured *in vitro* in a fast, quantifiable manner. Endothelial cells mixed with conditioned media and plated on Matrigel were used. The endothelial cells form vessels-like structures in response to angiogenic signals found in conditioned media and visualized when treated with calcein AM prior to the assay and tubes visualized through fluorescence or confocal microscopy. Using this approach we conclude that tube formation was more pronounced in ECs from CTEPH than controls. This effect involved FGF-2 pathways and was abolished in response to FGFR1 antagonist. Thus suggests that the neovascularization of thrombus in CTEPH involved FGF-2 with autocrine loop manner. This process was established because all the actors are present and the conditions are optimal. In the thrombus we found endothelial cell and/or its progenitor and a large amount of FGF-2 synthesized by endothelial cells and stored in the ECM and liberated progressively. It is clearly established that significant amounts of FGF-2 are associated with the ECM of in vitro cell cultures [15, 16]. In vivo, FGF-2 has been detected in the basal lamina of blood capillaries, primarily at sites of vessel branching and in the endothelium of the capillaries of tumors [17, 18], suggesting that endothelial cell-derived FGF-2 may mediate angiogenesis/vasculogenesis with an autocrine mode of action. This

hypothesis is supported by the observation that FGF-2 has an autocrine effect on several cell functions required for angiogenesis, including proliferation, migration, proteinase production, and integrin expression [19, 20]. Here we demonstrated clearly that FGF-2 plays a key role in the neovascularization of thrombus tissues. However, we do not know if this neovascularization is beneficial or fatal in CTEPH. This alteration affects exclusively the pulmonary circulation because the level of circulating FGF-2 is not affected. This study opens towards a new way and a new therapeutic target in the CTEPH, which it is interesting to hold in consideration.

## References

1. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004;23(4):637–648.
2. Pengo V, Lensing AWA, Prins MH, et al. Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 2004;350(22):2257–2264.
3. Tapson VF, Humbert M. Incidence and prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from acute to chronic pulmonary embolism. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(7):564–567.
4. Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, et al. Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension (CTEPH) Results From an International Prospective Registry. *Circulation* 2011;124(18):1973–1981.
5. Henke PK, Varga A, De S, et al. Deep Vein Thrombosis Resolution Is Modulated by Monocyte CXCR2-Mediated Activity in a Mouse Model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(6):1130–1137.
6. Wakefield TW, Strieter RM, Wilke CA, et al. Venous Thrombosis–Associated Inflammation and Attenuation With Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(2):258–268.
7. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(3):235-53.
8. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(7):1855-62
9. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):159-78.
10. Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, et al. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell.* 2000;(3):743-50.
11. Plotnikov AN1, Schlessinger J, Hubbard SR, et al. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell.* 1999;98(5):641-50.
12. Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, et al. Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J Cell Physiol.* 1989;140(1):75-81.
13. Moscatelli D. Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix. *J Biol Chem.* 1992;267(36):25803-9

14. Flaumenhaft R1, Moscatelli D, Rifkin DB. Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1990;111(4):1651-9.
15. Vlodavsky I, Fridman R, Sullivan R, Sasse J, Klagsbrun M. Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J Cell Physiol.* 1987;131(3):402-8.
16. Bashkin P1, Doctrow S, Klagsbrun M, et al. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry.* 1989;28(4):1737-43.
17. Folkman J1, Klagsbrun M, Sasse J, et al. A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am J Pathol.* 1988;130(2):393-400.
18. DiMario J, Buffinger N, Yamada S, Strohman RC. Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science.* 1989;244(4905):688-90.
19. Delli-Bovi P1, Curatola AM, Newman KM, et al. Processing, secretion, and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential. *Mol Cell Biol.* 1988 Jul;8(7):2933-41.
20. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(24):11007-11.

## Figures legends

**Figure 1.** Organized, collagen-rich material in CTEPH is shown with Masson's trichrome staining (Left A). Organized, collagen-rich material (blue), and recent, non-organized fibrin-rich material (red). The organized portion was estimated at 65 per cent. (Right A) Organized, collagen-rich material in CTEPH is shown with HES staining (red), with peripheral organization by fibroblasts/myofibroblasts and numerous neovessels (black arrows). These images are at a magnification of 40X. CD117, CD34 and CD31 expression was determined in specific parts of CTEPH thrombus sections (black frame in Masson's trichrome staining). Immunofluorescence analysis demonstrating the expression and localization of CD31/CD34 or/and CD117/CD34. No immunoreactivity is detected in cells incubated with secondary antibody, but no primary antibody. Scale bar : 50  $\mu$ m.

**Figure 2.** Angiogenic factors expression pattern in CTEPH thrombus. To quantify angiogenesis in CTEPH thrombus lysates (n=40), protein levels of ANG-1, ANG-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, SDF-1 and FGF-2 were assessed by ELISA. High levels of FGF-2 were found in CTEPH thrombus. ANG-1, ANG-2 and SDF-1 levels were also high. Very low levels of VEGFA, VEGF-C and VEGF-D in thrombus of CTEPH patients were found.

**Figure 3.** CTEPH-PEC show increased production of known angiogenic factors in their culture media. (A) The levels of ANG-1 and ANG-2 were significantly decreased in the culture media of CTEPH-PEC compared to controls. (B) The level of VEGF-C and -D was higher in culture media from CTEPH PEC than from control PEC. There was no difference in the level of VEGF-A. (C) The level of FGF-2 was significantly higher in CTEPH-PEC culture media than in control PEC culture media. Data is expressed as mean  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

**Figure 4.** Angiogenic factors mRNA levels (ANG-1, ANG-2, TIE-2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFR1, VEGFR2, SDF-1, FGF-2, FGFR1 and FGFR2) assessed by real-time quantitative PCR in P-ECs obtained from CTEPH or from controls. Values are mean  $\pm$  SEM from 10 controls and 10 patients with CTEPH. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  compared with control P-ECs.

**Figure 5.** FGF-2 promotes endothelial tube formation with CTEPH PEC. To determine the FGF-2 potential modulator role of in the angiogenesis of CTEPH, Matrigel technique was used. CTEPH-PECs induce more tube formation than PEC control in basal condition or with 10% of FCS. FGF-2 enhanced endothelial cell tube formation; this phenomenon is stopped when FGF-2's activity is blocked (Figure 5A). The blockade of VEGF receptor did not show tube formation (Figure 5B). When the cells were treated with ANG-1 and ANG-2, there is less tube formation than FGF-2 treatment. The blockade of TIE-2 shows a decrease of tube formation (Figure 5C). When Control-PECs were incubated with CTEPH-PEC media, there is an increase of tube formation. When CTEPH-PECs were incubated with Control-PECs media there wasn't any difference in tube formation (Figure 5D).



Figure 1

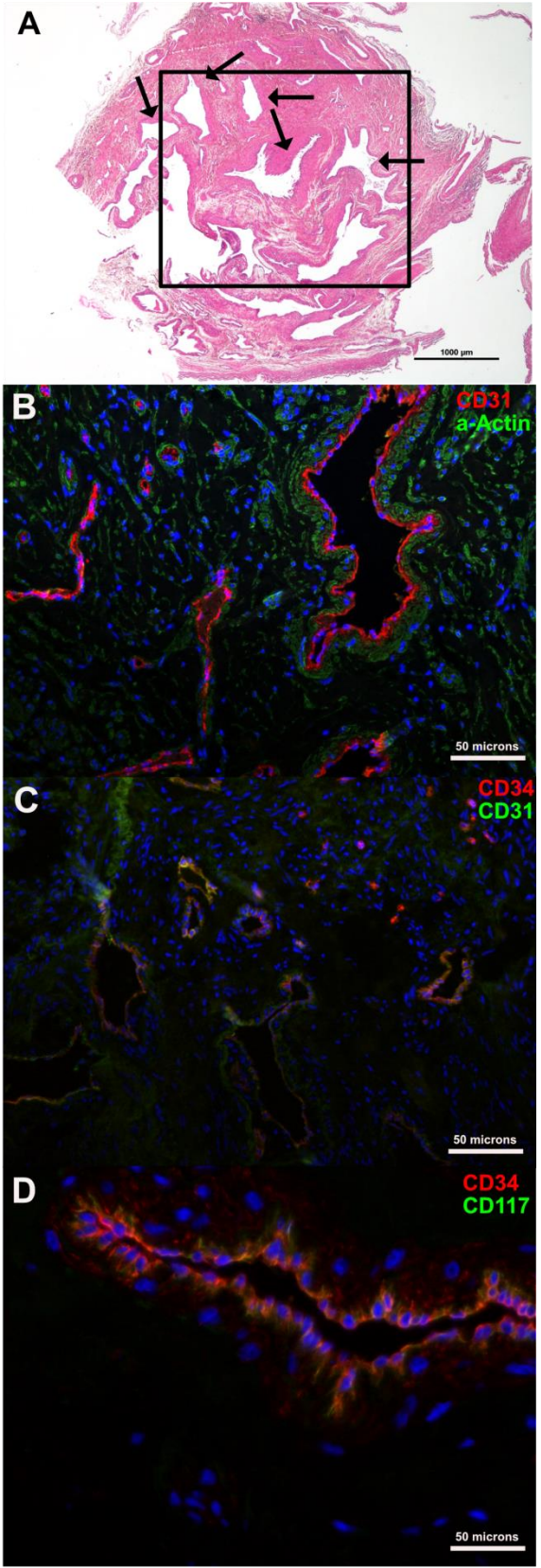
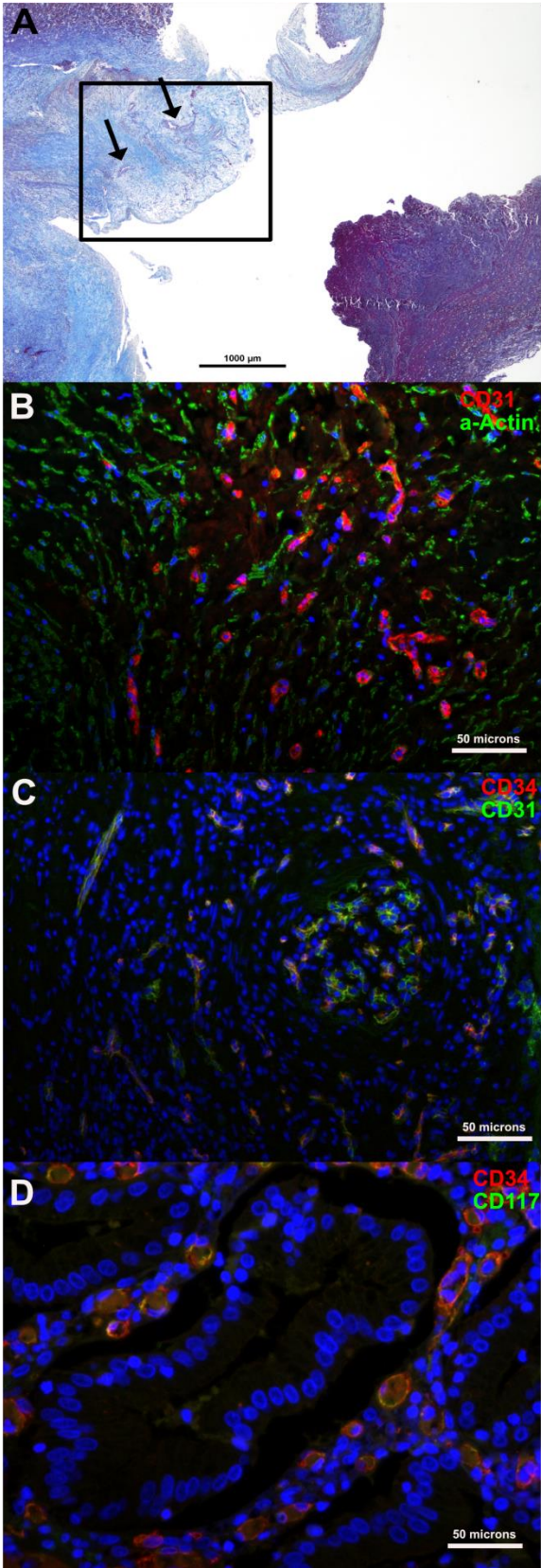


Figure 2

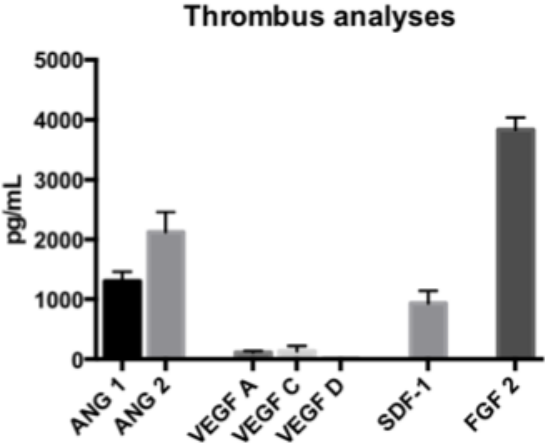


Figure 3

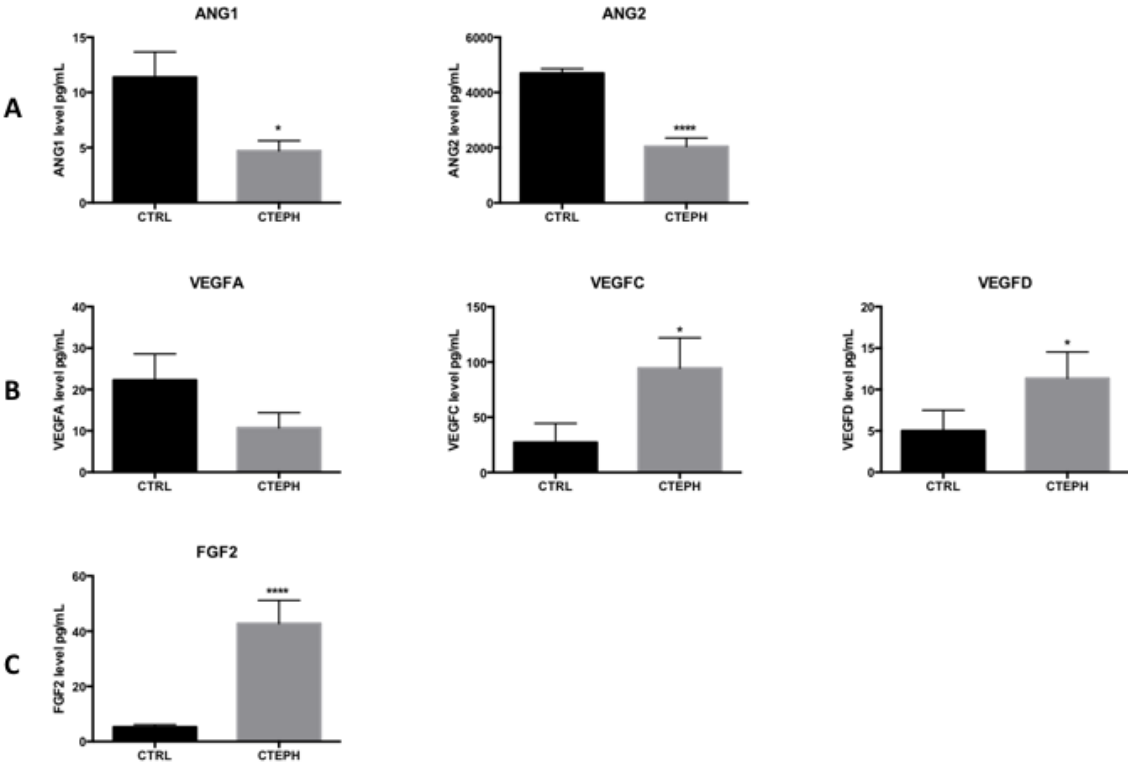


Figure 4

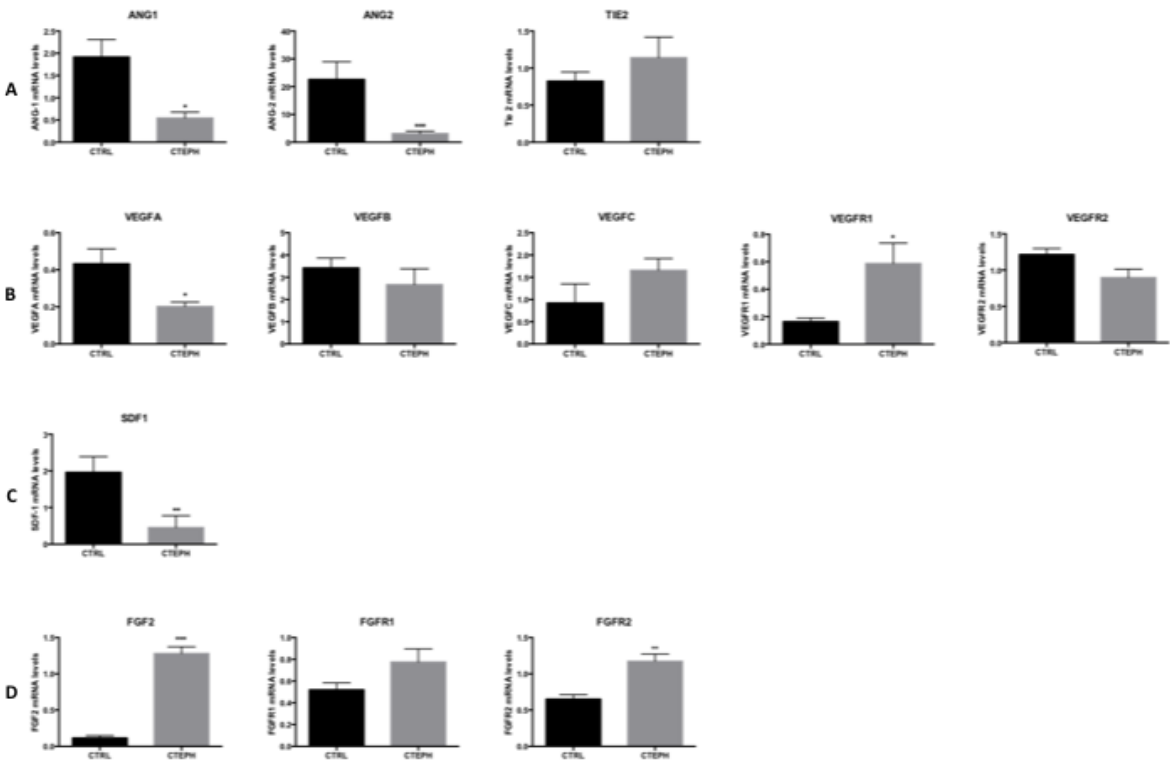


Figure 5A

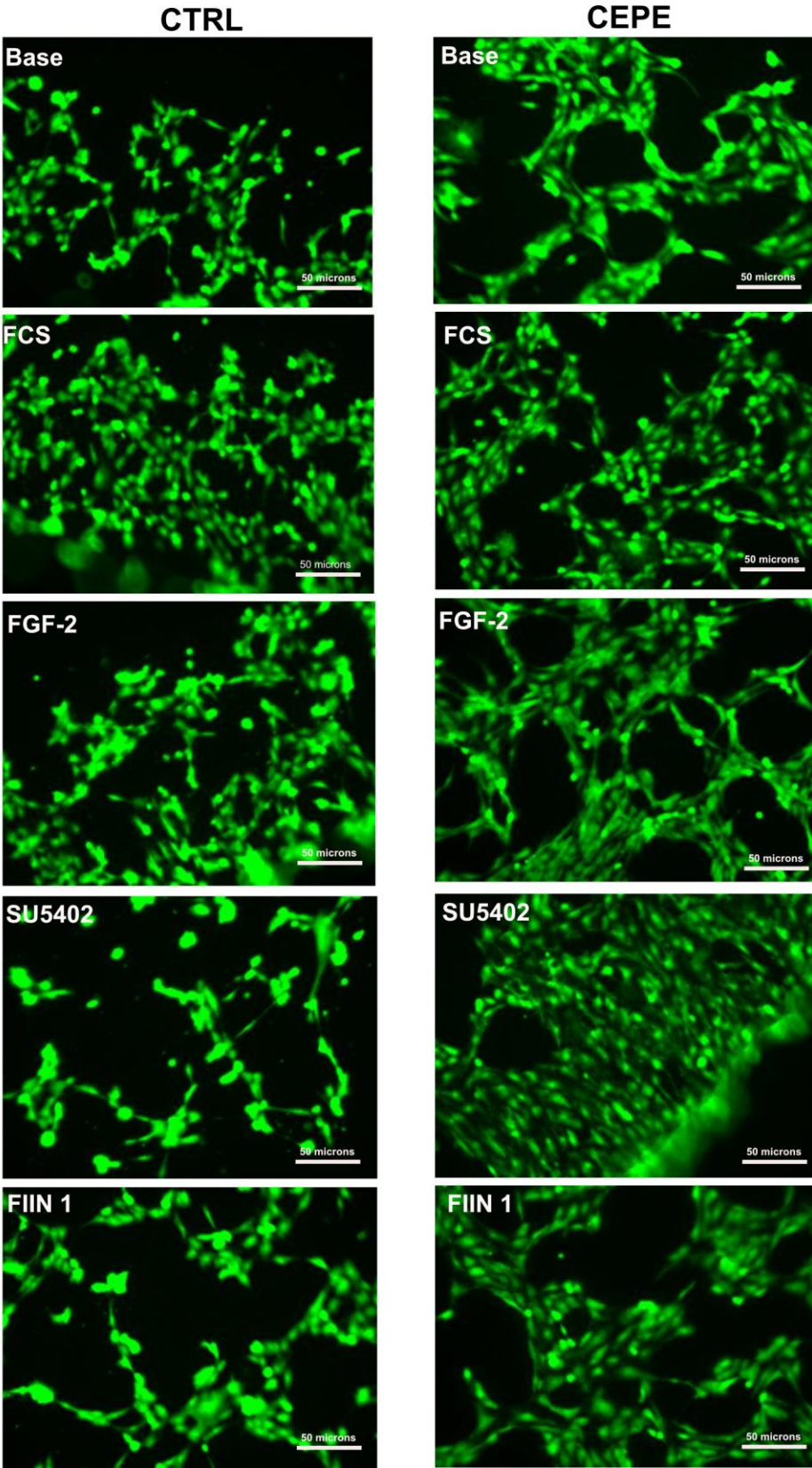


Figure 5B

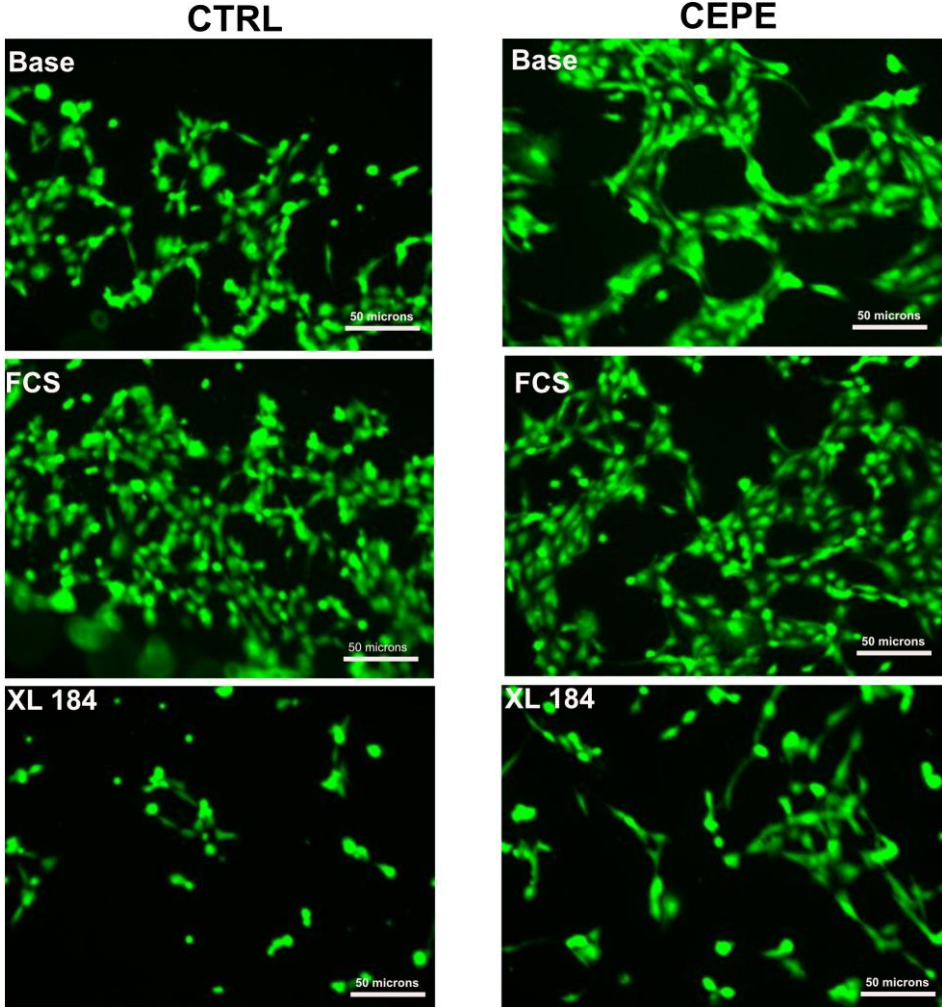


Figure 5C

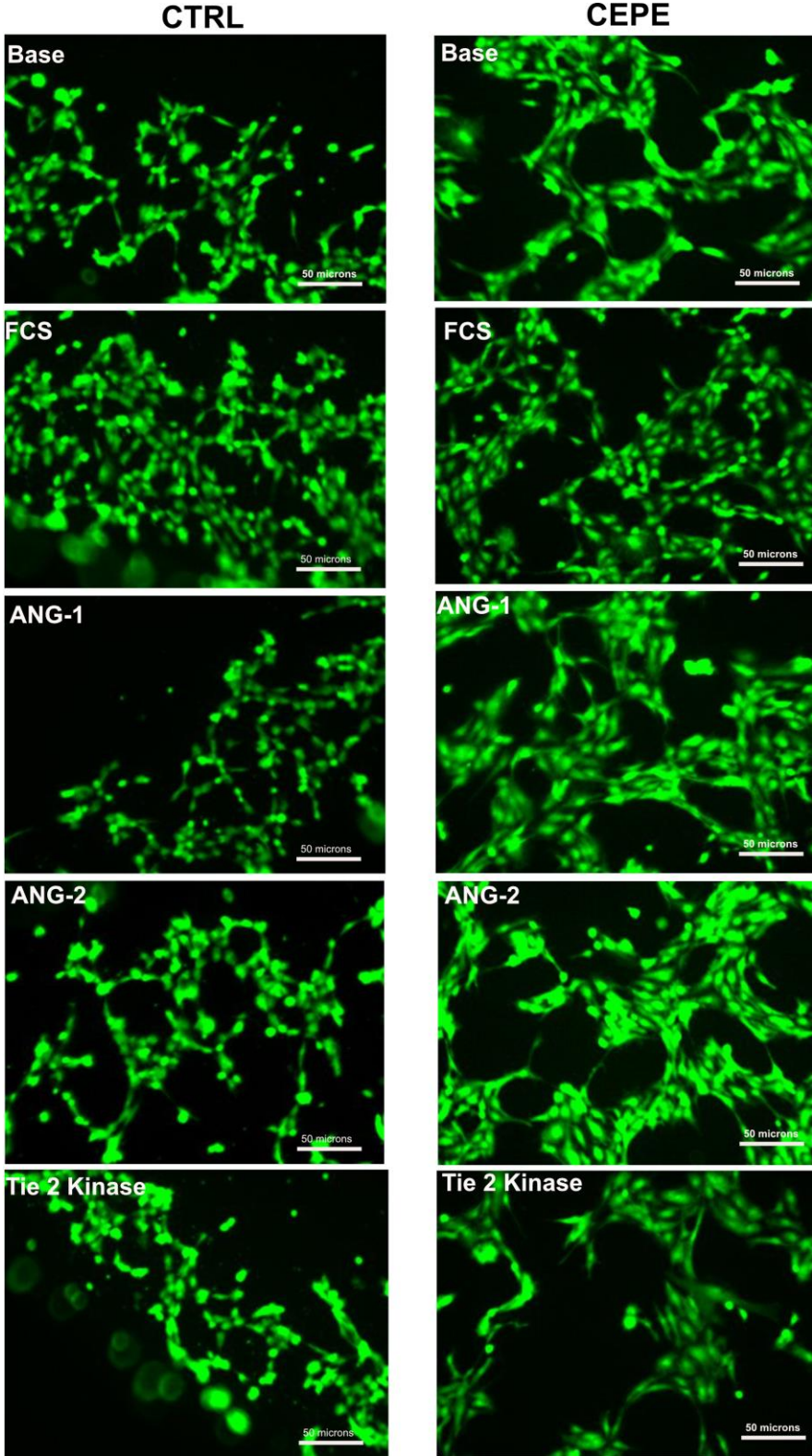
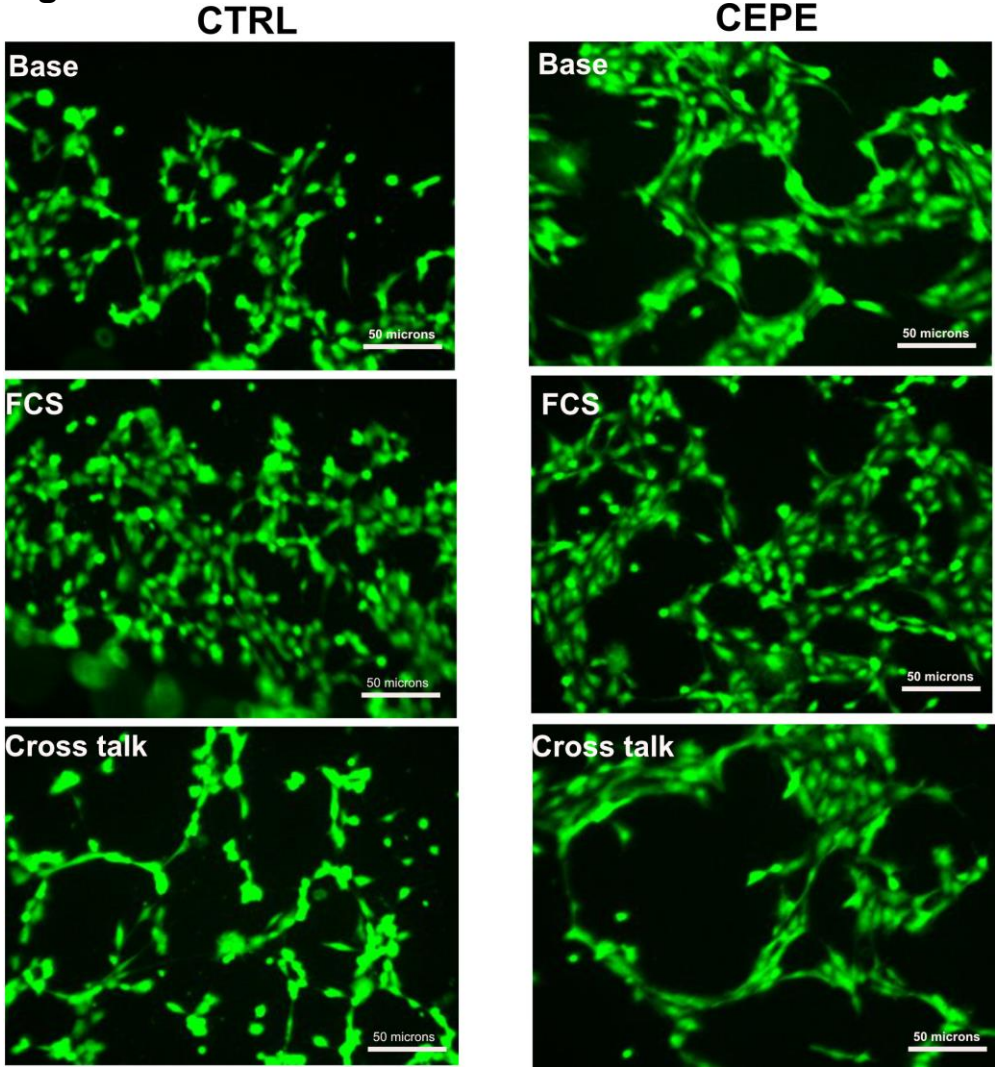


Figure 5D



# DISCUSSION



# Discussion

---

La physiopathologie de l'HPPE est un processus complexe et multifactoriel résultant initialement de l'embolie pulmonaire. Cependant, sa connaissance reste incomplète. Bien que cette pathologie soit curable chirurgicalement, les mécanismes qui impliquent la formation et la persistance d'un séquestre conduisant à un remodelage vasculaire fibreux, restent à ce jour inconnu.

L'endothélium pulmonaire étant directement en contact avec le séquestre, il est possible que cette maladie soit provoquée par une dysfonction de ces cellules endothéliales pulmonaires. Cette dysfonction endothéliale est un facteur connu et observé dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAPi qui implique éventuellement la synthèse et la sécrétion anormale de facteur de croissance et / ou de cytokines. Etant donné leur interaction avec le séquestre et les résultats observés dans d'autres types d'hypertension pulmonaire, l'hypothèse majeure de ce travail de thèse est que la cellule endothéliale pulmonaire joue un rôle central dans la pathogénèse de l'HPPE.

Ce travail de thèse a pour but d'améliorer les connaissances sur cette pathogénèse et plus particulièrement de mieux comprendre le phénotype anormal de la CE pulmonaire des patients souffrant d'HPPE et des facteurs qu'elles sécrètent en vue d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour commencer ce travail, nous avons cherché à déterminer la composition et la structure des séquestres obtenus par endartériectomie pulmonaire. Nous les avons évalués de façon macroscopique et microscopique par coloration. Nous avons estimé la composition en pourcentage de séquestre organisé (collagène) et celui des zones de fibrine. Le ratio moyen obtenu est de 74% de séquestre organisé (collagène/fibrose) et 26% de zones de fibrine. La portion organisée des séquestres est majoritairement composée de fibroblastes / myofibroblastes, de cellules inflammatoires (principalement les lymphocytes et les macrophages) et de nombreux néo-vaisseaux de taille variable, appelés vaisseaux de perméabilisation.

Dans cette première étude, nous montrons que la CE pulmonaire contribue à un état inflammatoire chez les patients souffrant d'HPPE et que la production accrue de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance par les CE stimulent la croissance des CML et augmente la migration des monocytes. À notre connaissance, ceci est la plus grande étude à ce jour qui examine les CE de patients souffrant d'HPPE et est la première à montrer comment les changements de l'endothélium pulmonaire peuvent affecter d'autres cellules clés.

Ces résultats soulignent l'importance de l'inflammation dans la pathogenèse globale de l'HPPE et suggèrent un mécanisme potentiel pour la prolifération cellulaire accrue et une infiltration inflammatoire observée dans les séquestres obtenus après endartériectomie pulmonaire.

L'une des questions fondamentales dans l'HPPE est de savoir comment la présence de séquestre non résolu au sein des artères pulmonaires conduit à cette organisation de fibrose. Par conséquent, cette étude se concentre sur la physiopathologie sous-jacente de la progression du caillot à la fibrose. Notre hypothèse étant que les changements dans l'endothélium de l'artère pulmonaire contribuent au remodelage vasculaire pathogène dans l'HPPE. Les cytokines inflammatoires ont été associées à d'autres aspects pathologiques de la maladie (Boulate et al., 2015; von Haehling et al., 2010).

Les patients atteints d'HPPE montrent un remodelage conséquent de l'artère pulmonaire et la prolifération des cellules musculaires lisses. Nous avons constaté une croissance accrue de CML lorsque celles-ci sont mises en contact avec du surnageant de CE d'HPPE. Cela pourrait être dû à une communication paracrine de la CE avec les autres cellules comme le montre l'augmentation du taux de FGF-2 dans le surnageant des CE d'HPPE. En effet, le taux de FGF-2 des patients HPPE n'étant pas différent de celui des contrôles mais était significativement plus élevé dans les milieux de culture.

Cet effet est similaire à celui observé dans l'HTAPi. En effet, l'expression ou l'activité accrue de facteurs de croissance, comme le FGF, le PDGF et l'EGF, ont montré qu'ils étaient responsables de la stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses et qu'ils conduisent à un remodelage vasculaire pulmonaire obstructif (Izikki et al., 2009; Merklinger et al., 2005; Perros et al., 2008).

Bien que le rôle des cellules endothéliales dans la prolifération des CML via la synthèse de facteur de croissance ait été étudié dans l'HTAP, cette étude est le premier travail en vue d'identifier un mécanisme similaire dans l'HPPE (Eddahibi et al., 2006; Izikki et al., 2009).

Comme le FGF-2, MCP-1 induit également une prolifération des cellules musculaires lisses dans l'HTAP (Sanchez et al., 2007). Des études antérieures ont montré que MCP-1 est principalement exprimé dans l'endothélium des patients HPPE, suggérant que la CE pulmonaire pourrait être la principale cause de l'expression anormale de MCP-1 (Kimura et al., 2001). Nous avons trouvé que le taux de MCP-1 était significativement plus élevé dans le surnageant des CE d'HPPE que dans celui des CE contrôles. Le taux plasmatique de MCP-1 est également augmenté de manière significative chez les patients HPPE. Cette surexpression de MCP-1 pourrait stimuler une prolifération des CML et peut contribuer au remodelage vasculaire pathogène.

MCP-1 est un puissant agent chimio-attractif pour les cellules inflammatoires et stimulant pour la fibrose. MCP-1 stimule l'expression des gènes du collagène sécrété par les fibroblastes et du TGF- $\beta$ 1. Il stimule également l'inflammation physiologique et pathologique comme dans l'athérosclérose (Gharaee-Kermani et al., 1996; Liptay et al., 1993). Les monocytes de contrôle et de patients HPPE ont montré une augmentation de leur migration lorsqu'elle est exposée au surnageant de CE d'HPPE. Cet effet a été nettement diminué lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur de MCP-1. Ces résultats suggèrent un rôle central de MCP-1 pour attirer les monocytes vers le séquestre et la paroi des vaisseaux des patients HPPE.

D'autres études ont montré qu'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire surexprimée chez les patients atteints d'HTAP et d'HPPE (von Haehling et al., 2010; Humbert et al., 1995; Soon et al., 2010). Nous avons observé une augmentation d'IL-6 dans le surnageant des CE d'HPPE par rapport aux témoins. Ceci conforte notre hypothèse selon laquelle la CE participe à l'état inflammatoire observé chez les patients HPPE. Le rôle potentiel de l'inflammation dans la physiopathologie de l'HPPE a été largement décrit. L'augmentation de cette inflammation chez les patients atteints d'HPPE n'est pas uniquement présente au niveau du poumon mais elle se manifeste également de manière systémique (Bonderman et al., 2009; Quarck et al., 2009). Des taux plus élevés d'IL-6 et d'IL-1 trouvés dans le surnageant des CE d'HPPE suggèrent que la CE peut stimuler cet état inflammatoire.

Les taux accrus de facteurs de croissance (FGF-2), des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-6) et des médiateurs de l'infiltration des monocytes et de la fibrose (MCP-1) dans le surnageant des CE d'HPPE suggèrent que la CE joue un rôle central dans la pathogenèse de l'HPPE. De plus, nous avons constaté que les taux plasmatiques de VCAM-1 et d'ICAM-1 sont élevés chez les patients HPPE et le taux d'ICAM-1 est augmenté dans le surnageant des CE d'HPPE. VCAM-1 et ICAM-1 sont des protéines qui sont capables de promouvoir l'adhérence des monocytes en réponse à une stimulation de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) induite par la CRP. L'augmentation de leur expression est un marqueur de l'activation des cellules endothéliales (Szmitko et al., 2003). L'activation et la dysfonction des CE se manifestent par l'expression aberrante de ces protéines. Ceci pourrait expliquer la progression pathologique d'un séquestre non résolu vers un remodelage vasculaire chronique fibreux.

Bien que nous ayons trouvé des taux accrus de molécules potentiellement pathogènes dans le plasma des patients HPPE, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre ces taux et le degré de sévérité de l'HPPE.

Des corrélations entre les taux sériques de l'IL-6, la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) et la pression auriculaire droite, ont déjà pu être établies dans d'autres études (Kimura et al., 2001; Zabini et al., 2014).

Toutefois, cette étude porte sur une plus grande cohorte de patients HPPE que les études précédentes et donc cette absence de corrélation peut s'expliquer par une plus grande diversité de patients.

Les points de faiblesse de cette étude porte essentiellement sur notre population contrôle. En effet, la population contrôle n'est pas un bon contrôle car elle présente une pathologie inflammatoire connue. Cette étude est principalement descriptive et suggère un rôle potentiel de la CE pulmonaire dans la physiopathologie de l'HPPE mais ne prouve pas un lien de causalité. Toutefois, il existe plusieurs différences importantes entre la population contrôle et HPPE. Nous avons utilisé des patients subissant une résection pulmonaire pour une tumeur maligne en tant que témoins. La présence d'une pathologie maligne étant un état inflammatoire connu, cela pourrait avoir diminué les différences observées au niveau des taux des molécules inflammatoires. De plus, il y avait beaucoup plus de fumeurs dans la population témoin que dans

la population HPPE. Le tabagisme est également connu pour induire une inflammation et augmenter le taux d'IL-6 (McEvoy et al., 2015).

Après avoir mis en évidence la dysfonction endothéliale dans l'HPPE et avoir identifié des cibles moléculaires potentielles à l'origine de cette altération, nous nous sommes intéressés à la protéine ICAM-1.

Dans un second travail, nous avons voulu montrer qu'ICAM-1 contribue à la croissance des cellules endothéliales et induit une résistance à l'apoptose en stimulant l'activation de certains effecteurs comme la survivine, Src et ERK. Cet effet était plus marqué dans les CE de patients atteints d'HPPE que des contrôles. Ce phénomène est lié à une surexpression d'ICAM-1 dans les CE de patients HPPE, qui agit comme une boucle autocrine pour réguler la croissance des cellules endothéliales et leur viabilité. En effet l'inhibition de la synthèse ou l'action d'ICAM-1 va réduire significativement la croissance des CE et augmenter l'apoptose.

Des précédentes études in vitro et animales menées ont suggéré que l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose des CE est perturbée dans l'HPPE mais le mécanisme à l'origine de ce trouble reste à élucider.

Bien que l'apoptose soit un processus génétiquement contrôlé qui permet le renouvellement cellulaire normal, celui-ci est soumis à une régulation physiologique et physiopathologique médiée en partie par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Dans cette étude, nous avons pu montrer que ce phénomène est lié à une surexpression d'ICAM-1 par ces cellules. ICAM-1 est une glycoprotéine de surface de 505 acides aminés. C'est un membre de la superfamille des immunoglobulines des molécules d'adhésion. ICAM-1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération cellulaire, l'adhérence et la migration (Roebuck, 1999; Roebuck et Finnegan, 1999; Witkowska et Borawska, 2004).

L'activation du récepteur d'ICAM-1 induit l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme Src et ERK1/2 qui sont nécessaires à la fonction principale de la cellule comme la migration cellulaire, la prolifération et l'apoptose. De ce fait, nous avons déterminé le rôle d'ICAM-1 dans la CE chez les patients HPPE. En condition basale, nous avons constaté que

la croissance des CE et la résistance à l'apoptose étaient plus élevées chez les patients HPPE que chez les contrôles.

Ce phénomène a été associé à une augmentation du taux de Src phosphorylé et ERK1/2. L'inhibition de la synthèse ou l'activité d'ICAM-1 a réduit la croissance et augmenté l'apoptose des CE.

Nous avons montré précédemment que le surnageant des CE contient une grande quantité de facteurs de croissance (PDGF, EGF et FGF-2) impliqués dans le maintien de la croissance des cellules endothéliales et la résistance à l'apoptose.

Dans ce travail, nous avons montré qu'ICAM-1 a eu un rôle crucial dans le contrôle de ces processus et pourrait expliquer les mécanismes dans l'altération du phénotype de la CE de l'HPPE.

ICAM-1 est connue surtout pour son rôle dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire et dans l'inflammation. Ce travail est le premier à étudier le rôle d'ICAM-1 dans la régulation de la fonction endothéliale.

En effet, la CE synthétise une grande quantité d'ICAM-1 en particulier chez les patients HPPE mais pas de son récepteur LFA-1, ce qui nous a permis d'envisager une boucle autocrine probable d'ICAM-1 dans le contrôle de la fonction de la CE (Grzelewska-Rzymowska et Pietrkowicz, 2004). Mais nous ne pouvons pas exclure la participation d'autres facteurs de croissance, tels que le FGF2 et le VEGF pour soutenir la croissance des CE et réduire l'apoptose.

Cependant, ICAM-1 contribue de manière significative au maintien de la fonction anormale de la CE dans l'HPPE. Tout d'abord, l'augmentation de la production d'ICAM-1 a été associée à une augmentation de la croissance et une résistance à l'apoptose de la CE. En second lieu, l'activation du récepteur d'ICAM-1 augmente la phosphorylation de Src qui augmente l'activité ERK par la Raf kinase. Ces réponses ont été plus marquées dans l'HPPE mais complètement réduites après inhibition de la synthèse ou de l'activité d'ICAM-1.

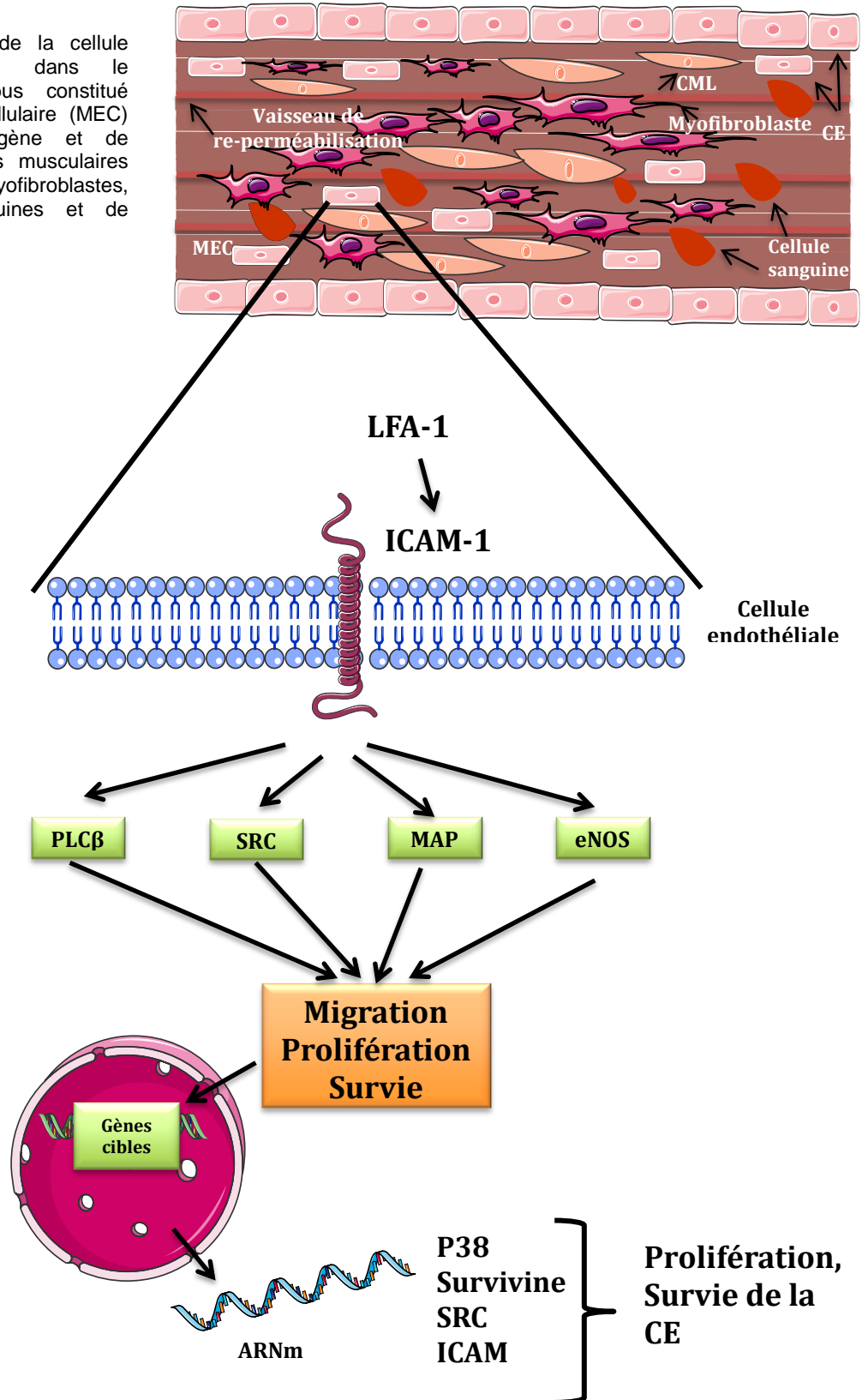
Dans ce travail, nous avons également étudié la conséquence de la surexpression d'ICAM-1 dans la synthèse de la survivine par les CE. Pour élargir notre recherche au-delà de la croissance classique des facteurs déjà cités, nous avons étudié la contribution possible d'ICAM-1

dans la synthèse de la survivine dans les CE, une autre protéine impliquée dans le processus d'angiogenèse en réduisant l'apoptose, ainsi que de favoriser la prolifération des cellules endothéliales et la migration.

Le polymorphisme 469 E/K d'ICAM a déjà été mis en évidence dans des maladies cardiovasculaires (Tabatabai et al., 2014). Nos données suggèrent que la fréquence du génotype E (EE et EK) est significativement plus élevée dans l'HPPE par rapport aux témoins ( $p < 0,001$ ) et est associée à un risque accru de développer cette maladie. Toutefois, nous n'avons pas établi de corrélation entre la fréquence des allèles et les paramètres hémodynamiques dans l'HPPE. En outre, il n'y avait aucune différence entre la production d'ICAM-1 par les cellules endothéliales et leurs génotypes chez les patients HPPE. Ces résultats suggèrent que le polymorphisme du gène ICAM-1 qui entraîne la substitution de la lysine au glutamate (K469E), peut avoir une influence sur l'interaction entre ICAM-1 et son récepteur (Borozdenkova et al., 2001). Cette information apportera une valeur fonctionnelle dans l'étiologie de l'hypertension pulmonaire post-embolique.

## Artère pulmonaire de patient atteint d'HPPE

**Figure 24:** Rôle de la cellule endothéliale (CE) dans le maintien du thrombus constitué de matrice extracellulaire (MEC) (formée de collagène et de fibrine), de cellules musculaires lisses (CML), de myofibroblastes, de cellules sanguines et de





En résumé, cette étude met en évidence un nouveau mécanisme par lequel la surproduction endothéliale d'ICAM-1 contribue de manière autocrine, non seulement au phénotype résistant à l'apoptose mais aussi au phénotype prolifératif de la CE de séquestre dans l'HPPE. En effet, la CE peut survivre au sein du séquestre grâce à la synthèse continue d'ICAM-1 mais c'est grâce à la survie de la cellule que celle-ci synthétise de manière continue ICAM-1 (boucle autocrine).

Nous avons obtenu des preuves que ce phénomène était lié à l'activation de Src et par conséquent d'ERK1/2 qui contribue au phénotype prolifératif des CE dans l'HPPE.

Nous montrons qu'ICAM-1 module aussi l'expression de la survivine qui est un facteur angiogénique puissant. La survivine est généralement exprimée dans les tissus embryonnaires, mais est exprimée faiblement dans la plupart des tissus adultes normaux et est surexprimée dans la majorité des cancers humains. La survivine est un facteur anti-apoptotique favorisant les propriétés de la division cellulaire et l'angiogénèse. Nous avons observé une surexpression de survivine dans les CE dans l'HPPE. En effet, le niveau d'expression des protéines de signalisation chute de façon spectaculaire lorsqu'ICAM-1 est inhibée.

Toutes nos données soutiennent l'idée que la surproduction d'ICAM-1 dans les CE dans l'HPPE contribue à plusieurs aspects différents de la maladie comme la migration des leucocytes et l'inflammation par l'intermédiaire d'effet paracrine. Nous avons montré une nouvelle facette d'ICAM-1 et son implication dans le maintien d'un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose dans les CE dans l'HPPE via une boucle autocrine. ICAM-1 permet ainsi la survie et la prolifération de la cellule endothéliale au sein du séquestre.

De plus, ces résultats suggèrent que la voie de signalisation d'ICAM-1 peut représenter une cible thérapeutique intéressante dans l'HPPE.

Dans la dernière partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au processus de revascularisation du séquestre observés dans l'HPPE.

Nous avons montré que la persistance du séquestre est associée à une néo-vascularisation de ce tissu. Nous avons pu voir que ce phénomène implique le recrutement de progéniteurs endothéliaux et leur différenciation en cellules endothéliales.

A travers différentes expériences, nous avons observé que la protéine FGF-2 était hautement synthétisée par les cellules endothéliales et stockée dans la matrice extracellulaire du séquestre.

A travers cette étude, nous avons pu voir que la formation de tubules à partir de cellules endothéliales en culture était plus marquée chez les HPPE que pour les témoins. Cette expérience reproduisant ce processus d'angiogénèse in vitro est médiée par les deux récepteurs de FGF-2 (FGF-R1 et FGF-R2) chez les HPPE.

Dans un premier temps, nous avons examiné les caractéristiques histologiques et la composition cellulaire des séquestres obtenus après endartériectomie pulmonaire. Les données obtenues sont cohérentes avec des études antérieures qui montrent un remodelage des séquestres en lien avec une grande quantité de collagène et de fibrine. En outre, nous avons pu identifier différents types de cellules au sein du séquestre comme les monocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales ainsi que des progéniteurs endothéliaux.

L'organisation du séquestre et le ratio fibrine / collagène est différent selon la zone étudiée et l'âge de développement du séquestre. Cependant, toutes les formes de séquestres présentent une néo-vascularisation. Les parois des nouveaux vaisseaux sont composées par des cellules endothéliales matures et ses précurseurs. En effet par immunohistochimie, nous avons révélé la présence de nombreuses cellules positives pour le CD31 et CD34. Cette observation suggère que la vascularisation des séquestres est liée à un recrutement et à la maturation de cellules progénitrices endothéliales résidentes. Ce processus de néo-vasculogénèse est caractérisé par la formation de novo de cellules endothéliales à partir de ces précurseurs. Ce processus est différent de l'angiogénèse qui est un processus physiologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de vaisseaux préexistants.

Ce processus est généralement régulé par deux facteurs principaux le VEGF et le FGF-2.

Pour étudier le rôle de chacune des voies impliquées dans la vascularisation du séquestre, nous avons mesuré les taux de différents facteurs angiogéniques dans des séquestres obtenus après endartériectomie pulmonaire de patients atteints d'HPPE.

Comme le montre nos résultats, le tissu contient un taux élevé de FGF-2 et une faible concentration de VEGF.

Nous avons également cherché à déterminer l'origine de FGF-2 et nous avons montré la synthèse accrue de FGF-2 par les cellules endothéliales. En effet, les cellules endothéliales isolées à partir de patients ayant une HPPE sécrètent trois fois plus de FGF-2 que celles des contrôles. Ceci suggère que le FGF-2 provenant des cellules endothéliales peut servir de médiateur à la fois autocrine et paracrine dans le processus de vascularisation.

Le FGF-2 a un effet direct sur plusieurs fonctions cellulaires nécessaires à la vascularisation, comme la prolifération, la migration et la formation de tubules. La vasculogénèse est un processus vital pour le développement normal des tissus et la cicatrisation des plaies, mais elle est également associée à divers états pathologiques.

En utilisant l'expérience de Matrigel, ce processus peut être évalué *in vitro* de manière quantifiable et rapide. Les cellules endothéliales ont été ensemencées sur le Matrigel et mises en présence de différents milieux conditionnés.

Les cellules endothéliales vont s'organiser sous forme de structure ressemblant à des vaisseaux en réponse aux signaux angiogéniques présents dans le milieu conditionné. En utilisant cette approche, nous concluons que la formation de tubules a été plus prononcée dans les CE d'HPPE que celle des témoins. Cet effet implique les voies de FGF-2 et est complètement inhibé lorsque les cellules sont traitées avec un antagoniste de FGF-R1.

Ceci montre que la néo-vascularisation du séquestre implique la protéine FGF-2.

Au sein de séquestre, nous avons observé des cellules endothéliales et/ou leurs progéniteurs et une grande quantité de FGF-2 synthétisé par les cellules endothéliales et stockés dans la matrice extracellulaire et libéré progressivement. Il a clairement été montré que des quantités importantes de FGF-2 sont dues aux cellules de la matrice extracellulaire (Bashkin et al., 1989; Vlodaysky et al., 1987).

*In vivo*, le FGF-2 a été détecté dans la membrane basale des capillaires sanguins principalement au niveau des sites de ramifications des vaisseaux et dans l'endothélium des vaisseaux capillaires de certaines tumeurs (DiMario et al., 1989; Folkman et al., 1988). Ceci montre que le FGF-2 produit par les cellules endothéliales dérivées peut servir de médiateur dans le processus d'angiogénèse / vasculogénèse de façon autocrine.

Cette hypothèse est étayée par l'observation selon laquelle le FGF-2 a un effet autocrine sur plusieurs fonctions cellulaires requises dans l'angiogenèse comme la prolifération, la migration, la production de protéinases et de l'expression d'intégrines (Mignatti et Rifkin, 1991; Mignatti et al., 1991; Sato and Rifkin, 1988).

Dans cette étude, nous avons clairement montré que FGF-2 joue un rôle clé dans la néo-vascularisation de séquestre. Cependant, nous ne savons pas si ce processus est bénéfique ou délétère dans l'HPPE. Cette modification affecte exclusivement la circulation pulmonaire parce que le taux de FGF-2 circulant n'est pas modifié. Cette étude nous ouvre vers une nouvelle approche dans la compréhension de la pathogénèse de l'HPPE en vue de devenir une nouvelle cible thérapeutique.

Pour résumer, dans ces travaux de thèse menés sur les CE de patients ayant une HPPE ont ainsi pu permettre :

- 1- De mettre en évidence une dysfonction des cellules endothéliales d'HPPE, de quantifier les différents facteurs à l'origine de cette dysfonction (Facteurs de croissance, molécules d'adhésion, cytokines inflammatoires)
- 2- De déterminer le rôle d'ICAM-1 dans cette dysfonction endothéliale
- 3- De mieux comprendre le phénomène de vasculogenèse par l'intermédiaire de la protéine FGF-2

# CONCLUSION

## Conclusion et perspectives

---

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HPPE) est une maladie rare et grave résultant d'une obstruction mécanique progressive des artères pulmonaires provoquant une augmentation progressive de la PAPm (>25 mmHg). Cette pathologie a un traitement chirurgical, l'endartériectomie pulmonaire. Bien que cette maladie ait un traitement, les mécanismes qui impliquent la formation et la persistance de séquestre conduisant à un remodelage vasculaire fibreux, restent à ce jour inconnu.

Au cours de ma thèse, j'ai pu mettre en évidence le phénotype anormal de la CE extraites des séquestres des patients ayant une HPPE ainsi que les anomalies moléculaires à l'origine de cette dysfonction. Ce travail a pu montrer que les CE d'HPPE se caractérisent par une prolifération, une migration, une survie et une réponse excessive à différents facteurs (ICAM-1 et FGF-2). La pathogénèse de l'HPPE présente de grandes similitudes avec celles de l'HTAPi. Plusieurs anomalies moléculaires sont à l'origine de ces perturbations fonctionnelles dont notamment une production et une libération anormale d'ICAM-1 et de FGF-2. En effet, nous avons démontré le rôle autocrine d'ICAM-1 dans le maintien du phénotype anormal de la CE dans l'HPPE et l'association du génotype KE à la maladie. On également pu mettre en évidence le rôle essentiel que joue FGF-2 dans la néo-vascularisation observée dans les séquestres de patients souffrant d'HPPE.

L'ensemble de ces travaux ouvre de nouvelles perspectives. En effet, il serait intéressant de savoir d'où proviennent les cellules endothéliales constitutives du séquestre et comment elles acquièrent ce phénotype anormal. Il serait également intéressant de savoir si ce phénomène peut être réversible au cours de la maladie. Le phénotype anormal de la CE implique différents facteurs, il serait donc intéressant de savoir dans quel ordre ces perturbations moléculaires surviennent. Ce travail a mis en évidence l'implication du FGF-2 dans la vasculogénèse du séquestre. Il serait intéressant de voir sur un modèle in vivo si l'injection de FGF-2 exogène augmenterait de manière significative l'angiogénèse du séquestre jusqu'à dissoudre le séquestre.

# **TRAVAUX ANNEXES**

## -Travail 1-

### Cardiovascular Research

#### The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload

--Manuscript Draft--

|   |  |
|---|--|
| Manuscript Number:                            |  |
| Full Title:                                   | The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload   |
| Short Title:                                  | Capillary Density-StrokeWork Mismatch and RV Adaptation  |
| Article Type:                                 | Original Article   |
| Keywords:                                     | Right Ventricle, Adaptive remodeling, Pulmonary Hypertension, Angiogenesis, Fibrosis   |
| Corresponding Author:                         | olaf mercier<br>Marie Lannelongue Hospital<br>Le Plessis Robinson, FRANCE  |
| Corresponding Author Secondary Information:   |  |
| Corresponding Author's Institution:           | Marie Lannelongue Hospital   |
| Corresponding Author's Secondary Institution: |  |
| First Author:                                 | Pierre-Emmanuel Noly, MD   |
| First Author Secondary Information:           |  |
| Order of Authors:                             | Pierre-Emmanuel Noly, MD<br>François Haddad, MD<br>Arthur-Ataam Jennifer, MSc<br>Nathaniel Langer, MD, MSc<br>Peter Dorfmueller, MD, PhD<br>Matthieu Glorion, MD<br>Julien Guihaire, MD, PhD<br>Benoit Decante, MSc<br>Lilia Lamrani, MSc<br>Florence Lecerf, BSc<br>Bruno Baudet, BSc<br>Frederic Secatore, BSc<br>Philippe Darteville, MD<br>Elie Fadel, MD, PhD<br>olaf mercier   |
| Order of Authors Secondary Information:       |  |
| Abstract:                                     | <p>Aims: Mechanisms of right ventricular (RV) adaptation to chronic pressure overload remain not well understood. We hypothesized that a lower capillary density(CD)/StrokeWork ratio will be associated with more fibrosis and RV maladaptive remodeling.</p> <p>Methods and results: We induced RV chronic pressure overload over a 20 weeks period in 2 piglet models of Pulmonary Hypertension (PH), i.e. a Shunt model (n=5) and a Chronic ThromboEmbolic PH (CTEPH) model (n=5). We assessed hemodynamics and RV remodeling as well as RV CD, RV fibrosis and angiogenic factors expression. In addition, we evaluated RV CD and fibrosis from Eisenmenger's</p> |

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation



|                      |   |
|----------------------|---|
|                      | <p>syndrome (ES, n=14) and non-ES PH patients (n=14) who underwent heart-lung transplantation.</p> <p>Although RV was similarly hypertrophied in both models, maladapted RV remodeling with impaired systolic function was only seen in the CTEPH group who had a lower CD (615±184vs.1213±74cap/mm<sup>2</sup> p=0.0005), a lower CD/StrokeWork ratio (0.29±0.07vs.0.82±0.16 p=0.02), a higher myocardial fibrosis (15.4±3.8%vs.8.0±2.5% p=0.003) as well as a higher angiogenic and fibrosis factors expression. Time from diagnosis to transplantation was longer for ES compared to non-ES patients. However, the RV CD and fibrosis were similar in both groups (1345±70.55 and 1242±93.02 cap/mm<sup>2</sup> p=0.76, 13.4± 1.1% vs.17.7± 2.1% p=0.23).</p> <p>Conclusions: Mismatch between angiogenesis and workload was associated with greater degree of myocardial fibrosis and RV dysfunction in two different PH animal models. At the time of end-stage RV failure, CD and fibrosis of human explanted hearts were similar regardless the cause of the RV failure. CD quantification seemed promising in predicting RV maladaptation to pressure overload.</p> |
| Suggested Reviewers: |   |
| Opposed Reviewers:   |   |

**The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload**

**Noly et al Capillary Density-StrokeWork Mismatch and RV Adaptation**

\*Pierre-Emmanuel Noly MD MSc<sup>1,3,4</sup>, \*François Haddad MD<sup>3,5</sup>, Jennifer Arthur Ataam MSc<sup>2,3</sup>, Nathaniel Langer MD<sup>1,3</sup>, Peter Dorfmueller MD PhD<sup>1,2,3,6</sup>, Matthieu Glorion MD MSc<sup>1,3,4</sup>, Julien Guihaire MD MSc<sup>2,3</sup>, Benoit Decante MSc<sup>3</sup>, Lilia Lamrani MSc<sup>3,4</sup>, Florence Lecerf BSc<sup>2</sup>, Bruno Baudet BSc<sup>3</sup>, Frederic Secatore BSc<sup>3</sup>, Philippe Dartevelle MD<sup>1,2,3,4</sup>, Elie Fadel MD PhD<sup>1,2,3,4</sup> and Olaf Mercier MD PhD<sup>1,2,3,4</sup>

1- Paris-Sud University and Paris-Saclay University, School of Medicine, Kremlin-Bicêtre, France

2- INSERM UMR-S 999, LabEx LERMIT, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

3- Surgical Research Lab, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson, France

4- Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-lung Transplantation, DHU Thorax Innovation, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

5- Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University, Palo Alto, California, USA

6- Department of Pathology, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

**The importance of Capillary Density/Stroke Work Mismatch for Right Ventricular adaptation to Chronic Pressure Overload**

**ABSTRACT**

**Aims:** Mechanisms of right ventricular (RV) adaptation to chronic pressure overload remain not well understood. We hypothesized that a lower capillary density(CD)/StrokeWork ratio will be associated with more fibrosis and RV maladaptive remodeling.

**Methods and results:** We induced RV chronic pressure overload over a 20 weeks period in 2 piglet models of Pulmonary Hypertension (PH), i.e. a Shunt model (n=5) and a Chronic ThromboEmbolic PH (CTEPH) model (n=5). We assessed hemodynamics and RV remodeling as well as RV CD, RV fibrosis and angiogenic factors expression. In addition, we evaluated RV CD and fibrosis from Eisenmenger's syndrome (ES, n=14) and non-ES PH patients (n=14) who underwent heart-lung transplantation.

Although RV was similarly hypertrophied in both models, maladapted RV remodeling with impaired systolic function was only seen in the CTEPH group who had a lower CD ( $615 \pm 184$  vs.  $1213 \pm 74$  cap/mm<sup>2</sup>  $p=0.0005$ ), a lower CD/StrokeWork ratio ( $0.29 \pm 0.07$  vs.  $0.82 \pm 0.16$   $p=0.02$ ), a higher myocardial fibrosis ( $15.4 \pm 3.8\%$  vs.  $8.0 \pm 2.5\%$   $p=0.003$ ) as well as a higher angiogenic and fibrosis factors expression. Time from diagnosis to transplantation was longer for ES compared to non-ES patients. However, the RV CD and fibrosis were similar in both groups ( $1345 \pm 70.55$  and  $1242 \pm 93.02$  cap/mm<sup>2</sup>  $p=0.76$ ,  $13.4 \pm 1.1\%$  vs.  $17.7 \pm 2.1\%$   $p=0.23$ ).

**Conclusions:** Mismatch between angiogenesis and workload was associated with greater degree of myocardial fibrosis and RV dysfunction in two different PH animal

models. At the time of end-stage RV failure, CD and fibrosis of human explanted hearts were similar regardless the cause of the RV failure. CD quantification seemed promising in predicting RV maladaptation to pressure overload.

Abstract word count: 249

## **-TRAVAIL 2-**

Word count: /3000 words

Abstract: 200/200

Title: Right Ventricular Lesions and Biomarkers in Acute on Chronic Pulmonary Hypertension

David Boulate MD, MSc, Jennifer Arthur Ataam, MSc, Andrew Conolly, MD, Peter Dorfmueller, MD, PhD, Genevieve Giraldeau, MD, Marc Humbert, MD, PhD, Frederic Perros, PhD, Elie Fadel, MD, PhD, Francois Haddad, MD, and Olaf Mercier, MD, PhD

Short running head: right ventricle / acute on chronic pulmonary hypertension

Affiliations: DB, JAA, EF and OM: Surgical Research Laboratory, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, France; PD, FP and MH: INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, France; AC and FH: Cardiovascular institute, Stanford University, CA, USA; GG: Institut de Cardiologie de Montréal, Montreal, Canada.

Corresponding author: Dr David Boulate. Address: Surgical Research Laboratory, Hôpital Marie Lannelongue, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France. Email address: [d.boulate@ccml.fr](mailto:d.boulate@ccml.fr)

Funding: DB was funded by ADETEC (Association Chirurgicale pour le Développement et l'Amélioration des Techniques de Dépistage et de Traitement des Maladies Cardio-vasculaires).

Prior abstract publication: A part of the presented data was presented at the annual symposium of the American Thoracic Society in 2014 at Denver, USA.

Take home message: Right ventricular focal ischemic lesions and increased troponin characterize acute on chronic pulmonary hypertension

## **ABSTRACT**

**Aim:** To determine right ventricular (RV) pathological lesions and biomarkers in acute on chronic pulmonary hypertension (ACPH).

**Methods:** We induced ACPH in 9 large white pigs by saline infusion and acute pulmonary embolisms until hemodynamic compromise followed by dobutamine infusion for less than 3 hours. We evaluated right ventricular function, ventriculo-arterial coupling, pathological lesions, autophagy and circulating biomarkers. We compared RV pathological lesions and biomarkers with a chronic pulmonary hypertension (n=5) and a control group (n=5). We analysed RV lesions of 4 patients with primary pulmonary hypertension who developed acute hemodynamic compromise and emergent heart-lung transplantation.

**Results:** Mean pulmonary artery pressure over mean systemic pressure ratio increased 2.18 folds while dobutamine restored systemic pressure, cardiac output and ventriculo-arterial coupling after hemodynamic compromise. We found RV subepicardial and subepicardial focal ischemic lesions significant increase in the ACPH group. Hs-Troponin I, interleukin-6, CXCL9 and MMP9 increased significantly with development of ACPH. LC3 II, an autophagy marker, was significantly increased in RV in ACPH group. In patients, we found subendocardial focal ischemic lesions with concentrations of autophagy proteins in peri-infarct zones.

**Conclusion:** Right ventricular focal ischemic lesions develop within few hours in a new large animal model of ACPH associated with increase in troponin and inflammatory biomarkers.

## -TRAVAIL 3-

MS#ATVB/2016/307541 revised version

### 1 **The pivotal role of Src in human and experimental pulmonary** 2 **arterial hypertension**

3

4 **Sana Bentebbal, PhD<sup>1,2,5</sup> Jennifer Arthur Ataam, PhD<sup>1,2</sup> Olaf Mercier, PhD, MD<sup>1,2,4</sup>**  
5 **Younss Ait Mou, PhD<sup>3</sup> Florence Lecerf, MS<sup>2</sup> Peter Dorfmueller, PhD, MD<sup>1,2</sup> Elie Fadel,**  
6 **PhD, MD<sup>1,2,4</sup> Marc Humbert, PhD, MD<sup>1,2</sup> Saadia Eddahibi, PhD<sup>5</sup>**

7

8 <sup>1</sup> Univ. Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France;

9 <sup>2</sup> INSERM UMR-S 999, Labex LERMIT, Hypertension Artérielle Pulmonaire:  
10 Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le  
11 Plessis-Robinson, France

12 <sup>3</sup> Qatar Cardiovascular Research Center (QCRC), Qatar Foundation, Doha, Qatar

13 <sup>4</sup> Service de Chirurgie Thoracique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-  
14 Robinson, France

15 <sup>5</sup> INSERM U1046, Centre Hospitalier Universitaire Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

16

17 **Running title: Src in idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension**

18

19 **Corresponding author's:**

20 Saadia Eddahibi, PhD INSERM U1046 - Hôpital Arnaud de Villeneuve  
21 371 avenue du doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier cedex 05, France  
22 Phone : + 33 467 415 247 / Fax: +33 467 415 242

23

24 **Keywords:** Idiopathic pulmonary arterial hypertension; vascular remodeling; pulmonary  
25 arterial smooth muscle cells,

26

27 Subject codes: Hypertension

28

29 Word count: 4839 (excluding the Materials and Methods)

30

31 Total number of figures and tables: 6 figures

32

33 TOC category: basic

34

35 TOC subcategory: vascular biology

36

**1 Abstract**

2 Objective– Idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) is associated with an  
3 exaggerated pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) proliferation. Compelling  
4 evidence suggests that receptor tyrosine kinases (RTKs) play central role in this abnormal  
5 phenotype. Dasatinib, a tyrosine kinase inhibitor that targets Src, has shown beneficial  
6 effects on experimental models of PAH. In contrast, recent works have identified nine cases  
7 of dasatinib-induced PAH. It has been suggested that this could be due to Src inhibition.  
8 Here, we examined the effects of Src inhibition by two specific inhibitors, PP2 and KX2-391,  
9 on PA-SMCs proliferation and PAH development.

10 Approach and Results– Src expression and activity were measured by qPCR and western  
11 blot in PA-SMCs from iPAH patients and controls. Activity was investigated by measuring Src  
12 phosphorylation states in response to RTKs activation. The consequence of PP2 and KX2-  
13 391 was assessed in vitro on PA-SMCs growth and in vivo on monocrotaline-induced  
14 pulmonary hypertension in rats.

15 Src mRNA and protein levels were increased in iPAH PA-SMCs. RTKs stimulation with  
16 growth factors induced Src phosphorylation on tyrosine-416 and consequently Src activation.  
17 Src inhibitors reduced PA-SMCs proliferation. Treatment with Src inhibitors reversed  
18 monocrotaline-induced PH in rats with decreased pulmonary arterial pressure, right  
19 ventricular hypertrophy and muscularization of distal pulmonary arteries. KX2-391 was more  
20 potent than PP2 in both in vitro and in vivo studies.

21 Conclusions– Our results suggest that iPAH PA-SMCs proliferation in response to RTKs  
22 activation was associated to Src dysregulation. Src inhibition has shown a beneficial effects  
23 and KX2-391 constitute a potential therapeutic tool in PAH.

24

**25 Abbreviations:**

26 Pulmonary arterial pressure (PAP), idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH);  
27 pulmonary arterial hypertension (PAH); pulmonary hypertension (PH); pulmonary artery  
28 smooth muscle cells (PA-SMCs); receptor tyrosine kinases (RTKs); monocrotaline (MCT);  
29 platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth  
30 factor (EGF) and 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d] pyrimidine (PP2);  
31





ORIGINAL PRE-CLINICAL SCIENCE

## Pulmonary microvascular lesions regress in reperfused chronic thromboembolic pulmonary hypertension



David Boulate, MD, MSc,<sup>a</sup> Frédéric Perros, PhD,<sup>b</sup> Peter Dorfmueller, MD, PhD,<sup>a,b,c,d</sup> Jennifer Arthur-Ataam, MSc,<sup>a,b</sup> Julien Guihaire, MD, MSc,<sup>a</sup> Lilia Lamrani, MSc,<sup>c</sup> Benoit Decante, MSc,<sup>a</sup> Marc Humbert, MD, PhD,<sup>b,d,f</sup> Saadia Eddahibi, PhD,<sup>b</sup> Philippe Dartevelle, MD,<sup>a,b,d,e</sup> Elie Fadel, MD, PhD,<sup>a,b,d,e</sup> and Olaf Mercier, MD, PhD<sup>a,b,d,e</sup>

From the <sup>a</sup>Laboratoire de Recherche Chirurgicale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson; <sup>b</sup>INSERM U999, Labex IERMIT, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson; <sup>c</sup>Service d'Anatomopathologie, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson; <sup>d</sup>Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; <sup>e</sup>Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et de Transplantation Cardiopulmonaire, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson; and the <sup>f</sup>Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

### KEYWORDS:

pulmonary endarterectomy; microvascular disease; pulmonary hypertension; chronic thromboembolic pulmonary hypertension; endothelin-1; interleukin-6

**BACKGROUND:** Pulmonary microvascular disease (PMD) develops in both occluded and non-occluded territories in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) and may cause persistent pulmonary hypertension after pulmonary endarterectomy. Endothelin-1 (ET-1) and interleukin-6 (IL-6) are potential PMD severity biomarkers, but it remains unknown whether they are related to occluded or non-occluded territories. We assessed PMD and ET-1/IL-6 gene expression profiles in occluded and non-occluded territories with and without chronic lung reperfusion in an animal CTEPH model.

**METHODS:** Chronic PH was induced in 10 piglets by left pulmonary artery (PA) ligation followed by weekly embolization of right lower lobe arteries with embocrylate tissue adhesive for 5 weeks. At Week 6, 5 of 10 animals underwent left PA reperfusion. At Week 12, animals with and without reperfusion were compared with sham animals ( $n = 5$ ). Hemodynamics, lung morphometry and ET-1/IL-6 gene expression profiles were assessed in the left lung (LL, occluded territories) and right upper lobe (RUL, non-occluded territories).

**RESULTS:** At Week 12, mean PA pressure remained elevated without reperfusion ( $29.0 \pm 2.8$  vs  $27.0 \pm 1.1$  mm Hg,  $p = 0.502$ ), but decreased after reperfusion ( $30.0 \pm 1.5$  vs  $20.5 \pm 1.7$  mm Hg,  $p = 0.013$ ). Distal media thickness in the LL and RUL PAs and systemic vasculature to the LL were significantly lower in the reperfused and sham groups compared with the non-reperfused group. PMD progression was related to ET-1 and IL-6 gene expression in the RUL and to the ET-A/ET-B gene expression ratio in the LL.

Reprint requests: Olaf Mercier, MD, PhD, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et de Transplantation cardio-pulmonaire, 133 Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France. Telephone: +33-140-948-695. Fax: +33-140-948-562.

E-mail address: [o.mercier@ocml.fr](mailto:o.mercier@ocml.fr)

1053-2498/\$ - see front matter © 2015 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2014.07.005>

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# Références bibliographiques

---

- Aguero, J., Ishikawa, K., Hadri, L., Santos-Gallego, C., Fish, K., Hammoudi, N., Chaanine, A., Torquato, S., Naim, C., Ibanez, B., et al. (2014). Characterization of right ventricular remodeling and failure in a chronic pulmonary hypertension model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *307*, H1204–H1215.
- Ali, T., Humphries, J., Burnand, K., Sawyer, B., Bursill, C., Channon, K., Greaves, D., Rollins, B., Charo, I.F., and Smith, A. (2006). Monocyte recruitment in venous thrombus resolution. *J. Vasc. Surg.* *43*, 601–608.
- Alias, S., Redwan, B., Panzenböck, A., Winter, M.P., Schubert, U., Voswinckel, R., Frey, M.K., Jakowitsch, J., Alimohammadi, A., Hobohm, L., et al. (2014). Defective angiogenesis delays thrombus resolution: a potential pathogenetic mechanism underlying chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 810–819.
- Amano, J., Ishiyama, S., Nishikawa, T., Tanaka, H., Nagai, R., Marumo, F., and Hiroe, M. (1997). Proliferation of smooth muscle cells in acute allograft vascular rejection. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *113*, 19–25.
- Anderson, E.G., Simon, G., and Reid, L. (1973). Primary and thrombo-embolic pulmonary hypertension: A quantitative pathological study. *J. Pathol.* *110*, 273–293.
- Andl, C.D., and Rustgi, A.K. (2005). No one-way street: cross-talk between e-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling: a mechanism to regulate RTK activity. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 28–31.
- Andreassen, A.K., Ragnarsson, A., Gude, E., Geiran, O., and Andersen, R. (2013). Balloon pulmonary angioplasty in patients with inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Heart Br. Card. Soc.* *99*, 1415–1420.
- Arbustini, E., Morbini, P., D'Armini, A.M., Repetto, A., Minzioni, G., Piovella, F., Viganó, M., and Tavazzi, L. (2002). Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation. *Heart* *88*, 177–182.
- Archer, S.L., Huang, J.M., Reeve, H.L., Hampl, V., Tolarová, S., Michelakis, E., and Weir, E.K. (1996). Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ. Res.* *78*, 431–442.
- Arcot, S.S., Fagerland, J.A., Lipke, D.W., Gillespie, M.N., and Olson, J.W. (1995). Basic fibroblast growth factor alterations during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Growth Factors Chur Switz.* *12*, 121–130.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* *97*, 512–523.

Arnaout, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.-P. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 495–507.

Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3203–3207.

Auger, W.R., Permpikul, P., and Moser, K.M. (1995). Lupus anticoagulant, heparin use, and thrombocytopenia in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a preliminary report. *Am. J. Med.* 99, 392–396.

Badesch, D.B., Raskob, G.E., Elliott, C.G., Krichman, A.M., Farber, H.W., Frost, A.E., Barst, R.J., Benza, R.L., Liou, T.G., Turner, M., et al. (2010). Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* 137, 376–387.

Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Cartron, J.P., and Gahmberg, C.G. (1995). The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur. J. Immunol.* 25, 3316–3320.

Balabanian, K., Foussat, A., Dorfmueller, P., Durand-Gassel, I., Capel, F., Bouchet-Delbos, L., Portier, A., Marfaing-Koka, A., Krzysiek, R., Rimaniol, A.-C., et al. (2002). CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1419–1425.

Barna, B.P., Pettay, J., Barnett, G.H., Zhou, P., Iwasaki, K., and Estes, M.L. (1994). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J. Neuroimmunol.* 50, 101–107.

Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman, J., and Vlodavsky, I. (1989). Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry (Mosc.)* 28, 1737–1743.

Bath, P.M., Hassall, D.G., Gladwin, A.M., Palmer, R.M., and Martin, J.F. (1991). Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol. Am. Heart Assoc.* 11, 254–260.

Bauer, M., Wilkens, H., Langer, F., Schneider, S.O., Lausberg, H., and Schäfers, H.-J. (2002). Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 105, 1034–1036.

Benezra, M., Vlodavsky, I., Ishai-Michaeli, R., Neufeld, G., and Bar-Shavit, R. (1993). Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 81, 3324–3331.

Benigni, A. (2000). Endothelin antagonists in renal disease. *Kidney Int.* 57, 1778–1794.

Benisty, J.I., McLaughlin, V.V., Landzberg, M.J., Rich, J.D., Newburger, J.W., Rich, S., and Folkman, J. (2004). Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 126, 1255–1261.

Bitler, B.G., Menzl, I., Huerta, C.L., Sands, B., Knowlton, W., Chang, A., and Schroeder, J.A. (2009). Intracellular MUC1 peptides inhibit cancer progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 100–109.

Blauwet, L.A., Edwards, W.D., Tazelaar, H.D., and McGregor, C.G.A. (2003). Surgical pathology of pulmonary thromboendarterectomy: a study of 54 cases from 1990 to 2001. *Hum. Pathol.* 34, 1290–1298.

Bohle, R.M., Hartmann, E., Kinfe, T., Ermert, L., Seeger, W., and Fink, L. (2000). Cell type-specific mRNA quantitation in non-neoplastic tissues after laser-assisted cell picking. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 68, 191–195.

Bonderman, D., Jakowitsch, J., Adlbrecht, C., Schemper, M., Kyrle, P.A., Schönauer, V., Exner, M., Klepetko, W., Kneussl, M.P., Maurer, G., et al. (2005). Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb. Haemost.* 93, 512–516.

Bonderman, D., Jakowitsch, J., Redwan, B., Bergmeister, H., Renner, M.-K., Panzenböck, H., Adlbrecht, C., Georgopoulos, A., Klepetko, W., Kneussl, M., et al. (2008). Role for staphylococci in misguided thrombus resolution of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 678–684.

Bonderman, D., Wilkens, H., Wakounig, S., Schäfers, H.-J., Jansa, P., Lindner, J., Simkova, I., Martischnig, A.M., Dudczak, J., Sadushi, R., et al. (2009). Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 33, 325–331.

Borozdenkova, S., Smith, J., Marshall, S., Yacoub, M., and Rose, M. (2001). Identification of ICAM-1 polymorphism that is associated with protection from transplant associated vasculopathy after cardiac transplantation. *Hum. Immunol.* 62, 247–255.

Boulate, D., Perros, F., Dorfmüller, P., Arthur-Ataam, J., Guihaire, J., Lamrani, L., Decante, B., Humbert, M., Eddahibi, S., Darteville, P., et al. (2015). Pulmonary microvascular lesions regress in reperfused chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 34, 457–467.

Brayman, M., Thathiah, A., and Carson, D.D. (2004). MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 2, 4.

Brown, Z., Strieter, R.M., Neild, G.H., Thompson, R.C., Kunkel, S.L., and Westwick, J. (1992). IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 42, 95–101.

Buczek-Thomas, J.A., Lucey, E.C., Stone, P.J., Chu, C.L., Rich, C.B., Carreras, I., Goldstein, R.H., Foster, J.A., and Nugent, M.A. (2004). Elastase mediates the release of growth factors from lung in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31, 344–350.

Budhiraja, R., Tuder, R.M., and Hassoun, P.M. (2004). Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 159–165.

Callewaere, C., Banisadr, G., Rostène, W., and Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J. Mol. Endocrinol.* 38, 355–363.

Cao, Y. (2013). Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol. Med.* 19, 460–473.

Carter, R.A., O'Donnell, K., Sachthep, S., Cicuttini, F., Boyd, A.W., and Wicks, I.P. (2001). Characterization of a human synovial cell antigen: VCAM-1 and inflammatory arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 79, 419–428.

Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A., and St Pierre, Y. (1998). Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 6398–6405.

Chaouat, A., Weitzenblum, E., and Higenbottam, T. (1996). The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 9, 356–363.

Charan, N.B., and Carvalho, P. (1997). Angiogenesis in bronchial circulatory system after unilateral pulmonary artery obstruction. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 82, 284–291.

Christman, B.W., McPherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M., and Loyd, J.E. (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327, 70–75.

Condliffe, R., Kiely, D.G., Gibbs, J.S.R., Corris, P.A., Peacock, A.J., Jenkins, D.P., Hodgkins, D., Goldsmith, K., Hughes, R.J., Sheares, K., et al. (2008). Improved outcomes in medically and surgically treated chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 1122–1127.

Condliffe, R., Kiely, D.G., Gibbs, J.S.R., Corris, P.A., Peacock, A.J., Jenkins, D.P., Goldsmith, K., Coghlan, J.G., and Pepke-Zaba, J. (2009). Prognostic and aetiological factors in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 33, 332–338.

Coppock, E.A., and Tamkun, M.M. (2001). Differential expression of K(V) channel alpha- and beta-subunits in the bovine pulmonary arterial circulation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L1350–L1360.

Coppock, E.A., Martens, J.R., and Tamkun, M.M. (2001). Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281, L1–L12.

Le Cras, T.D., Markham, N.E., Tuder, R.M., Voelkel, N.F., and Abman, S.H. (2002). Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L555–L562.

Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 5134–5138.

Dahal, B.K., Cornitescu, T., Tretyn, A., Pullamsetti, S.S., Kosanovic, D., Dumitrascu, R., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Voswinckel, R., Banat, G.-A., et al. (2010). Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181, 158–167.

Dartevelle, P., Fadel, E., Mussot, S., Chapelier, A., Hervé, P., de Perrot, M., Cerrina, J., Ladurie, F.L., Lehouerou, D., Humbert, M., et al. (2004a). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 23, 637–648.

Dartevelle, P., Fadel, E., Chapelier, A., Mussot, S., Cerrina, J., Leroy-Ladurie, F., Lehouerou, D., Humbert, M., Sitbon, O., Parent, F., et al. (2004b). [Surgical treatment of post-embolism pulmonary hypertension]. *Rev. Pneumol. Clin.* 60, 124–134.

Dewachter, L., Adnot, S., Fadel, E., Humbert, M., Maitre, B., Barlier-Mur, A.-M., Simonneau, G., Hamon, M., Naeije, R., and Eddahibi, S. (2006). Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174, 1025–1033.

Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., and Springer, T.A. (1990). ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 111, 3129–3139.

Dignat-George, F., Sampol, J., Lip, G., and Blann, A.D. (2003). Circulating endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33, 495–499.

DiMario, J., Buffinger, N., Yamada, S., and Strohman, R.C. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244, 688–690.

Dorfmueller, P., Günther, S., Ghigna, M.-R., Thomas de Montpréville, V., Boulate, D., Paul, J.-F., Jaïs, X., Decante, B., Simonneau, G., Dartevelle, P., et al. (2014). Microvascular disease in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a role for pulmonary veins and systemic vasculature. *Eur. Respir. J.* 44, 1275–1288.

Dowlati, A., Gray, R., Sandler, A.B., Schiller, J.H., and Johnson, D.H. (2008). Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab--an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 1407–1412.

Du, L., Sullivan, C.C., Chu, D., Cho, A.J., Kido, M., Wolf, P.L., Yuan, J.X.-J., Deutsch, R., Jamieson, S.W., and Thistlethwaite, P.A. (2003). Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 348, 500–509.

Dudek, S.M., and Fields, R.D. (2001). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activation in somatodendritic compartments: roles of action potentials, frequency, and mode of calcium entry. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC122.

Dudek, S.M., and Garcia, J.G. (2001). Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 1487–1500.

Duperray, A., Languino, L.R., Plescia, J., McDowall, A., Hogg, N., Craig, A.G., Berendt, A.R., and Altieri, D.C. (1997). Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J. Biol. Chem.* 272, 435–441.

Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A.-M., Dewachter, L., Fadel, E., Darteville, P., Humbert, M., Simonneau, G., Hanoun, N., Saurini, F., et al. (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113, 1857–1864.

Egermayer, P. (2000). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and upper limb thrombosis. *Eur. Respir. J.* 16, 187.

Escribano-Subias, P., Blanco, I., López-Meseguer, M., Lopez-Guarch, C.J., Roman, A., Morales, P., Castillo-Palma, M.J., Segovia, J., Gómez-Sanchez, M.A., Barberà, J.A., et al. (2012). Survival in pulmonary hypertension in Spain: insights from the Spanish registry. *Eur. Respir. J.* 40, 596–603.

Fadel, E., Mazmanian, G.M., Chapelier, A., Baudet, B., Detruit, H., de Montpreville, V., Libert, J.M., Wartski, M., Herve, P., and Darteville, P. (1998). Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1294–1300.

Fadel, E., Riou, J.Y., Mazmanian, M., Brenot, P., Dulmet, E., Detruit, H., Serraf, A., Bacha, E.A., Herve, P., and Darteville, P. (1999). Pulmonary thromboendarterectomy for chronic thromboembolic obstruction of the pulmonary artery in piglets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 117, 787–793.

Fadel, E., Mazmanian, G.M., Baudet, B., Detruit, H., Verhoye, J.P., Cron, J., Fattal, S., Darteville, P., and Herve, P. (2000). Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1429–1434.



Fadel, E., Michel, R.P., Eddahibi, S., Bernatchez, R., Mazmanian, G.-M., Baudet, B., Darteville, P., and Herve, P. (2004). Regression of postobstructive vasculopathy after revascularization of chronically obstructed pulmonary artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127, 1009–1017.

Fadel, E., Jais, X., Mercier, O., Mussot, S., Angel, C., Paul, J.-F., Humbert, M., Simonneau, G., and Darteville, P. (2008). Embolie pulmonaire chronique. *EMC - Tech. Chir. - Thorax* 3, 1–12.

Fagiani, E., and Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* 328, 18–26.

Falcetti, E., Hall, S.M., Phillips, P.G., Patel, J., Morrell, N.W., Haworth, S.G., and Clapp, L.H. (2010). Smooth muscle proliferation and role of the prostacyclin (IP) receptor in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1161–1170.

Fedullo, P.F., Auger, W.R., Kerr, K.M., and Rubin, L.J. (2001). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 345, 1465–1472.

Feinstein, J.A., Goldhaber, S.Z., Lock, J.E., Ferndandes, S.M., and Landzberg, M.J. (2001). Balloon pulmonary angioplasty for treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 103, 10–13.

Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., and Vlodavsky, I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* 130, 393–400.

De Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R., and Springer, T.A. (1991). Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174, 253–267.

Fowlkes, J.B., Strieter, R.M., Downing, L.J., Brown, S.L., Saluja, A., Salles-Cunha, S., Kadell, A.M., Wroblewski, S.K., and Wakefield, T.W. (1998). Ultrasound echogenicity in experimental venous thrombosis. *Ultrasound Med. Biol.* 24, 1175–1182.

Freed, D.H., Thomson, B.M., Tsui, S.S.L., Dunning, J.J., Sheares, K.K., Pepke-Zaba, J., and Jenkins, D.P. (2008). Functional and haemodynamic outcome 1 year after pulmonary thromboendarterectomy. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 34, 525–529; discussion 529–530.

Frenette, P.S., and Wagner, D.D. (1996). Adhesion molecules--Part 1. *N. Engl. J. Med.* 334, 1526–1529.

Frey, H., Schroeder, N., Manon-Jensen, T., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2013). Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.* 280, 2165–2179.

Fukui, S., Ogo, T., Goto, Y., Ueda, J., Tsuji, A., Sanda, Y., Kumasaka, R., Arakawa, T., Nakanishi, M., Fukuda, T., et al. (2015). Exercise intolerance and ventilatory inefficiency improve early after balloon pulmonary angioplasty in patients with inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int. J. Cardiol.* *180*, 66–68.

Gahmberg, C.G. (1997). Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 643–650.

Le Gal, G., Delahousse, B., Lacut, K., Malaviolle, V., Regina, S., Blouch, M.-T., Couturaud, F., Mottier, D., Oger, E., Gruel, Y., et al. (2007). Fibrinogen Aalpha-Thr312Ala and factor XIII-A Val34Leu polymorphisms in idiopathic venous thromboembolism. *Thromb. Res.* *121*, 333–338.

German, Z., Chambliss, K.L., Pace, M.C., Arnet, U.A., Lowenstein, C.J., and Shaul, P.W. (2000). Molecular basis of cell-specific endothelial nitric-oxide synthase expression in airway epithelium. *J. Biol. Chem.* *275*, 8183–8189.

Gharaee-Kermani, M., Denholm, E.M., and Phan, S.H. (1996). Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J. Biol. Chem.* *271*, 17779–17784.

Gjelstrup, L.C., Boesen, T., Kragstrup, T.W., Jørgensen, A., Klein, N.J., Thiel, S., Deleuran, B.W., and Vorup-Jensen, T. (2010). Shedding of large functionally active CD11/CD18 Integrin complexes from leukocyte membranes during synovial inflammation distinguishes three types of arthritis through differential epitope exposure. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 4154–4168.

Gouwy, M., Struyf, S., Catusse, J., Proost, P., and Van Damme, J. (2004). Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 185–194.

Greenway, S., van Suylen, R.J., Du Marchie Sarvaas, G., Kwan, E., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., and Rabinovitch, M. (2004). S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am. J. Pathol.* *164*, 253–262.

Groth, A., Vrugt, B., Brock, M., Speich, R., Ulrich, S., and Huber, L.C. (2014). Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respir. Res.* *15*, 47.

Grzelewska-Rzymowska, I., and Pietrkowicz, M. (2004). [Role of intra cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation]. *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* *16*, 179–182.

Guénard, H. (2001). *Physiologie humaine* (Pradel).

Guérin, L., Couturaud, F., Parent, F., Revel, M.-P., Gillaizeau, F., Planquette, B., Pontal, D., Guégan, M., Simonneau, G., Meyer, G., et al. (2014). Prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. Prevalence of CTEPH after pulmonary embolism. *Thromb. Haemost.* 112, 598–605.

Guihaire, J., Haddad, F., Boulate, D., Capderou, A., Decante, B., Flécher, E., Eddahibi, S., Dorfmueller, P., Hervé, P., Humbert, M., et al. (2014). Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 33, 194–202.

Von Haehling, S., von Bardeleben, R.S., Kramm, T., Thiermann, Y., Niethammer, M., Doehner, W., Anker, S.D., Munzel, T., Mayer, E., and Genth-Zotz, S. (2010). Inflammation in right ventricular dysfunction due to thromboembolic pulmonary hypertension. *Int. J. Cardiol.* 144, 206–211.

Harmey, J.H., and Bouchier-Hayes, D. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 280–283.

Harris, T.J.R., and McCormick, F. (2010). The molecular pathology of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 251–265.

Helfman, D.M., Kim, E.J., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2005). The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br. J. Cancer* 92, 1955–1958.

Henke, P.K., Wakefield, T.W., Kadell, A.M., Linn, M.J., Varma, M.R., Sarkar, M., Hawley, A., Fowlkes, J.B., and Strieter, R.M. (2001). Interleukin-8 administration enhances venous thrombosis resolution in a rat model. *J. Surg. Res.* 99, 84–91.

Henke, P.K., Varga, A., De, S., Deatrick, C.B., Eliason, J., Arenberg, D.A., Sukheepod, P., Thanaporn, P., Kunkel, S.L., Upchurch, G.R., et al. (2004). Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1130–1137.

Herve, P., Lau, E.M., Sitbon, O., Savale, L., Montani, D., Godinas, L., Lador, F., Jaïs, X., Parent, F., Günther, S., et al. (2015). Criteria for diagnosis of exercise pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 46, 728–737.

Hoeper, M.M., Mayer, E., Simonneau, G., and Rubin, L.J. (2006). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 113, 2011–2020.

Hoeper, M.M., Bogaard, H.J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., Langleben, D., Manes, A., Satoh, T., Torres, F., et al. (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, D42–D50.

Hogg, N., Henderson, R., Leitinger, B., McDowall, A., Porter, J., and Stanley, P. (2002). Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol. Rev.* 186, 164–171.

Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sitbon, O., Portier, A., Grangeot-Keros, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., and Emilie, D. (1995). Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151, 1628–1631.

Humbert, M., Monti, G., Fartoukh, M., Magnan, A., Brenot, F., Rain, B., Capron, F., Galanaud, P., Duroux, P., Simonneau, G., et al. (1998). Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur. Respir. J.* 11, 554–559.

Humphries, J., McGuinness, C.L., Smith, A., Waltham, M., Poston, R., and Burnand, K.G. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) accelerates the organization and resolution of venous thrombi. *J. Vasc. Surg.* 30, 894–899.

Van Hung, T., Emoto, N., Vignon-Zellweger, N., Nakayama, K., Yagi, K., Suzuki, Y., and Hirata, K. (2014). Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor under hypoxia causes severe, human-like pulmonary arterial hypertension in mice: potential roles of interleukin-6 and endothelin. *Life Sci.* 118, 313–328.

Inami, T., Kataoka, M., Shimura, N., Ishiguro, H., Yanagisawa, R., Taguchi, H., Fukuda, K., Yoshino, H., and Satoh, T. (2013). Pulmonary edema predictive scoring index (PEPSI), a new index to predict risk of reperfusion pulmonary edema and improvement of hemodynamics in percutaneous transluminal pulmonary angioplasty. *JACC Cardiovasc. Interv.* 6, 725–736.

Inoue, Y., King, T.E., Barker, E., Daniloff, E., and Newman, L.S. (2002). Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangiomyomatosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 765–773.

Izikki, M., Guignabert, C., Fadel, E., Humbert, M., Tu, L., Zadigue, P., Dartevielle, P., Simonneau, G., Adnot, S., Maitre, B., et al. (2009). Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 512–523.

Johnson-Léger, C., Aurrand-Lions, M., and Imhof, B.A. (2000). The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 6), 921–933.

Jones, J.L., and Walker, R.A. (1999). Integrins: a role as cell signalling molecules. *Mol. Pathol.* MP 52, 208–213.

Jones, P.L., Crack, J., and Rabinovitch, M. (1997). Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J. Cell Biol.* 139, 279–293.

Kamimura, D., Ishihara, K., and Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 149, 1–38.

Kang, C., Bonneau, M., Brouland, J.-P., Bal dit Sollier, C., and Drouet, L. (2003). In vivo pig models of venous thrombosis mimicking human disease. *Thromb. Haemost.* 89, 256–263.

Kang, X., Wang, F., Xie, J.-D., Cao, J., and Xian, P.-Z. (2005). Clinical evaluation of serum concentrations of intercellular adhesion molecule-1 in patients with colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 11, 4250–4253.

Kataoka, M., Inami, T., Hayashida, K., Shimura, N., Ishiguro, H., Abe, T., Tamura, Y., Ando, M., Fukuda, K., Yoshino, H., et al. (2012). Percutaneous transluminal pulmonary angioplasty for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 5, 756–762.

Kherbeck, N., Tamby, M.C., Bussone, G., Dib, H., Perros, F., Humbert, M., and Mouthon, L. (2013). The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 44, 31–38.

Kim, H., Yung, G.L., Marsh, J.J., Konopka, R.G., Pedersen, C.A., Chiles, P.G., Morris, T.A., and Channick, R.N. (2000a). Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 15, 640–648.

Kim, H., Yung, G.L., Marsh, J.J., Konopka, R.G., Pedersen, C.A., Chiles, P.G., Morris, T.A., and Channick, R.N. (2000b). Endothelin mediates pulmonary vascular remodelling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 15, 640–648.

Kimura, H., Okada, O., Tanabe, N., Tanaka, Y., Terai, M., Takiguchi, Y., Masuda, M., Nakajima, N., Hiroshima, K., Inadera, H., et al. (2001). Plasma monocyte chemoattractant protein-1 and pulmonary vascular resistance in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 319–324.

Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 614–625.

Kone, B.C., and Higham, S. (1999). Nitric oxide inhibits transcription of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha1-subunit gene in an MTAL cell line. *Am. J. Physiol.* 276, F614–F621.

Kouri, F.M., Queisser, M.A., Königshoff, M., Chrobak, I., Preissner, K.T., Seeger, W., and Eickelberg, O. (2008). Plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1872–1882.

Kragstrup, T.W., Jalilian, B., Hvid, M., Kjærgaard, A., Østgård, R., Schiøttz-Christensen, B., Jurik, A.G., Robinson, W.H., Vorup-Jensen, T., and Deleuran, B. (2014). Decreased plasma levels of soluble CD18 link leukocyte infiltration with disease activity in spondyloarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 16, R42.

Lang, I. (2010). Advances in understanding the pathogenesis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Br. J. Haematol.* 149, 478–483.

Lang, I.M. (2004). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension--not so rare after all. *N. Engl. J. Med.* 350, 2236–2238.

Lang, I.M., Marsh, J.J., Konopka, R.G., Oltman, M.A., Binder, B.R., Moser, K.M., and Schleef, R.R. (1993). Factors contributing to increased vascular fibrinolytic activity in mongrel dogs. *Circulation* 87, 1990–2000.

Lang, I.M., Marsh, J.J., Oltman, M.A., Moser, K.M., Loskutoff, D.J., and Schleef, R.R. (1994a). Expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in chronic pulmonary thromboemboli. *Circulation* 89, 2715–2721.

Lang, I.M., Marsh, J.J., Oltman, M.A., Moser, K.M., and Schleef, R.R. (1994b). Parallel analysis of tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor in plasma and endothelial cells derived from patients with chronic pulmonary thromboemboli. *Circulation* 90, 706–712.

Lang, I.M., Klepetko, W., and Pabinger, I. (1996). No increased prevalence of the factor V Leiden mutation in chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH). *Thromb. Haemost.* 76, 476–477.

Lannan, K.L., Phipps, R.P., and White, R.J. (2014). Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug Discov. Today* 19, 1230–1235.

Lebrazi, J., Elalamy, I., and Samama, M.M. (2003). In vitro effect of melagatran and lepirudin on clot-bound thrombin. *Thromb. Res.* 110, 249–252.

Legate, K.R., and Fässler, R. (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J. Cell Sci.* 122, 187–198.

Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 23, 397–418.

Liptay, M.J., Parks, W.C., Mecham, R.P., Roby, J., Kaiser, L.R., Cooper, J.D., and Botney, M.D. (1993). Neointimal macrophages colocalize with extracellular matrix gene expression in human atherosclerotic pulmonary arteries. *J. Clin. Invest.* 91, 588–594.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. (2000). *Cell-Cell Adhesion and Communication*.

Long, W.A., and Rubin, L.J. (1987). Prostacyclin and PGE1 treatment of pulmonary hypertension. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 773–776.

Lopes, A.A., Ferraz de Souza, B., and Maeda, N.Y. (2000a). Decreased sialic acid content of plasma von Willebrand factor in precapillary pulmonary hypertension. *Thromb. Haemost.* 83, 683–687.

Lopes, A.A., Maeda, N.Y., Gonçalves, R.C., and Bydlowski, S.P. (2000b). Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am. Heart J.* 139, 618–623.

Loscalzo, J. (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 333, 251–253.

Lum, H., and Malik, A.B. (1996). Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 787–800.

Luo, B.-H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 619–647.

Lüscher, T.F., and Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102, 2434–2440.

Madani, M.M., Auger, W.R., Pretorius, V., Sakakibara, N., Kerr, K.M., Kim, N.H., Fedullo, P.F., and Jamieson, S.W. (2012). Pulmonary endarterectomy: recent changes in a single institution's experience of more than 2,700 patients. *Ann. Thorac. Surg.* 94, 97–103; discussion 103.

Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1987). Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51, 813–819.

Marsh, J.J., Konopka, R.G., Lang, I.M., Wang, H.Y., Pedersen, C., Chiles, P., Reilly, C.F., and Moser, K.M. (1994). Suppression of thrombolysis in a canine model of pulmonary embolism. *Circulation* 90, 3091–3097.

Martens, J.R., Sakamoto, N., Sullivan, S.A., Grobaski, T.D., and Tamkun, M.M. (2001). Isoform-specific localization of voltage-gated K<sup>+</sup> channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae. *J. Biol. Chem.* 276, 8409–8414.

Mauritz, G.-J., Vonk-Noordegraaf, A., Kind, T., Surie, S., Kloek, J.J., Bresser, P., Saouti, N., Bosboom, J., Westerhof, N., and Marcus, J.T. (2012). Pulmonary endarterectomy normalizes interventricular dyssynchrony and right ventricular systolic wall stress. *J. Cardiovasc. Magn. Reson. Off. J. Soc. Cardiovasc. Magn. Reson.* 14, 5.

Mayer, E., Jenkins, D., Lindner, J., D'Armini, A., Kloek, J., Meyns, B., Ilkjaer, L.B., Klepetko, W., Delcroix, M., Lang, I., et al. (2011). Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an international prospective registry. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 141, 702–710.

Mazzone, A., and Ricevuti, G. (1995). Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80, 161–175.

McEver, R.P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 581–586.

McEvoy, J.W., Nasir, K., DeFilippis, A.P., Lima, J.A.C., Bluemke, D.A., Hundley, W.G., Barr, R.G., Budoff, M.J., Szklo, M., Navas-Acien, A., et al. (2015). Relationship of cigarette smoking with inflammation and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1002–1010.

McGuinness, C.L., Humphries, J., Waltham, M., Burnand, K.G., Collins, M., and Smith, A. (2001). Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi. *Thromb. Haemost.* 85, 1018–1024.

McLaughlin, V.V., Badesch, D.B., Delcroix, M., Fleming, T.R., Gaine, S.P., Galiè, N., Gibbs, J.S.R., Kim, N.H., Oudiz, R.J., Peacock, A., et al. (2009). End points and clinical trial design in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S97–S107.

McLaughlin, V.V., Davis, M., and Cornwell, W. (2011). Pulmonary arterial hypertension. *Curr. Probl. Cardiol.* 36, 461–517.

Mercier, O., and Fadel, E. (2013). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: animal models. *Eur. Respir. J.* 41, 1200–1206.

Mercier, O., Sage, E., de Perrot, M., Tu, L., Marcos, E., Decante, B., Baudet, B., Hervé, P., Darteville, P., Eddahibi, S., et al. (2009). Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137, 1538–1546.

Merklinger, S.L., Jones, P.L., Martinez, E.C., and Rabinovitch, M. (2005). Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 112, 423–431.

Michael, J.R., and Markewitz, B.A. (1996). Endothelins and the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 555–581.

Michel, R.P., and Hakim, T.S. (1991b). Increased resistance in postobstructive pulmonary vasculopathy: structure-function relationships. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 71, 601–610.

Michelakis, E.D. (2003). The role of the NO axis and its therapeutic implications in pulmonary arterial hypertension. *Heart Fail. Rev.* 8, 5–21.

Mignatti, P., and Rifkin, D.B. (1991). Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J. Cell. Biochem.* 47, 201–207.



Mignatti, P., Morimoto, T., and Rifkin, D.B. (1991). Basic fibroblast growth factor released by single, isolated cells stimulates their migration in an autocrine manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11007–11011.

Miles, L.A., Lighvani, S., Baik, N., Parmer, C.M., Khaldoyanidi, S., Mueller, B.M., and Parmer, R.J. (2014). New insights into the role of Plg-RKT in macrophage recruitment. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 309, 259–302.

Mitzner, W., and Wagner, E.M. (2004). Vascular remodeling in the circulations of the lung. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 97, 1999–2004.

Miyamoto, S., Nagaya, N., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Fujita, M., Nakanishi, N., and Miyatake, K. (2000). 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.* 161, 487–492.

Mizoguchi, H., Ogawa, A., Munemasa, M., Mikouchi, H., Ito, H., and Matsubara, H. (2012). Refined balloon pulmonary angioplasty for inoperable patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 5, 748–755.

Modarai, B., Burnand, K.G., Sawyer, B., and Smith, A. (2005a). Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi. *Circulation* 111, 2645–2653.

Modarai, B., Burnand, K.G., Humphries, J., Waltham, M., and Smith, A. (2005b). The role of neovascularisation in the resolution of venous thrombus. *Thromb. Haemost.* 93, 801–809.

Modarai, B., Humphries, J., Burnand, K.G., Gossage, J.A., Waltham, M., Wadoodi, A., Kanaganayagam, G.S., Afuwape, A., Paleolog, E., and Smith, A. (2008). Adenovirus-mediated VEGF gene therapy enhances venous thrombus recanalization and resolution. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1753–1759.

Montani, D., Humbert, M., and Souza, R. (2011). Letter by Montani et al regarding article, “Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension.” *Circulation* 123, e614; author reply e615.

Morris, T.A., Marsh, J.J., Chiles, P.G., Auger, W.R., Fedullo, P.F., and Woods, V.L. (2006). Fibrin derived from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension is resistant to lysis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 1270–1275.

Morris, T.A., Marsh, J.J., Chiles, P.G., Kim, N.H., Noskovack, K.J., Magana, M.M., Gruppo, R.A., and Woods, V.L. (2007). Abnormally sialylated fibrinogen gamma-chains in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb. Res.* 119, 257–259.

Morris, T.A., Marsh, J.J., Chiles, P.G., Magaña, M.M., Liang, N.-C., Soler, X., Desantis, D.J., Ngo, D., and Woods, V.L. (2009). High prevalence of dysfibrinogenemia among patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Blood* 114, 1929–1936.

Moser, K.M., and Bloor, C.M. (1993). Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 103, 685–692.

Moser, K.M., Guisan, M., Bartimmo, E.E., Longo, A.M., Harsanyi, P.G., and Chiorazzi, N. (1973). In vivo and post mortem dissolution rates of pulmonary emboli and venous thrombi in the dog. *Circulation* 48, 170–178.

Moser, K.M., Spragg, R.G., Utley, J., and Daily, P.O. (1983). Chronic thrombotic obstruction of major pulmonary arteries. Results of thromboendarterectomy in 15 patients. *Ann. Intern. Med.* 99, 299–304.

Moser, K.M., Cantor, J.P., Olman, M., Villespin, I., Graif, J.L., Konopka, R., Marsh, J.J., and Pedersen, C. (1991). Chronic pulmonary thromboembolism in dogs treated with tranexamic acid. *Circulation* 83, 1371–1379.

Nakamura, K., Akagi, S., Ogawa, A., Kusano, K.F., Matsubara, H., Miura, D., Fuke, S., Nishii, N., Nagase, S., Kohno, K., et al. (2012). Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* 159, 100–106.

Nakata, B., Hori, T., Sunami, T., Ogawa, Y., Yashiro, M., Maeda, K., Sawada, T., Kato, Y., Ishikawa, T., and Hirakawa, K. (2000). Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 1175–1179.

Nicaud, V., Poirier, O., Behague, I., Herrmann, S.M., Mallet, C., Troesch, A., Bouyer, J., Evans, A., Luc, G., Ruidavets, J.B., et al. (1999). Polymorphisms of the endothelin-A and -B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction: the Etude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Am. J. Hypertens.* 12, 304–310.

Ogawa, A., and Matsubara, H. (2015). Balloon Pulmonary Angioplasty: A Treatment Option for Inoperable Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Front. Cardiovasc. Med.* 2, 4.

Ogino, H., Ando, M., Matsuda, H., Minatoya, K., Sasaki, H., Nakanishi, N., Kyotani, S., Imanaka, H., and Kitamura, S. (2006). Japanese single-center experience of surgery for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Ann. Thorac. Surg.* 82, 630–636.

Oh, H.-M., Lee, S., Na, B.-R., Wee, H., Kim, S.-H., Choi, S.-C., Lee, K.-M., and Jun, C.-D. (2007). RKIKK motif in the intracellular domain is critical for spatial and dynamic organization of ICAM-1: functional implication for the leukocyte adhesion and transmigration. *Mol. Biol. Cell* 18, 2322–2335.

Olman, M.A., Marsh, J.J., Lang, I.M., Moser, K.M., Binder, B.R., and Schleef, R.R. (1992). Endogenous fibrinolytic system in chronic large-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 86, 1241–1248.

Opal, S.M., and DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162–1172.

Papapetropoulos, A., García-Cardeña, G., Dengler, T.J., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D., and Sessa, W.C. (1999). Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 79, 213–223.

Partovian, C., Adnot, S., Raffestin, B., Louzier, V., Levame, M., Mavier, I.M., Lemarchand, P., and Eddahibi, S. (2000). Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 762–771.

Pengo, V., Lensing, A.W.A., Prins, M.H., Marchiori, A., Davidson, B.L., Tiozzo, F., Albanese, P., Biasiolo, A., Pegoraro, C., Iliceto, S., et al. (2004). Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N. Engl. J. Med.* 350, 2257–2264.

Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselin, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., et al. (2008). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 81–88.

De Perrot, M., McRae, K., Shargall, Y., Thenganatt, J., Moric, J., Mak, S., and Granton, J.T. (2011). Early postoperative pulmonary vascular compliance predicts outcome after pulmonary endarterectomy for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest* 140, 34–41.

Piazza, G., and Goldhaber, S.Z. (2011). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 364, 351–360.

Pötgens, A.J., Westphal, H.R., de Waal, R.M., and Ruitter, D.J. (1995). The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 376, 57–70.

Price, L.C., Wort, S.J., Perros, F., Dorfmüller, P., Huertas, A., Montani, D., Cohen-Kaminsky, S., and Humbert, M. (2012). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141, 210–221.

Quarck, R., Nawrot, T., Meyns, B., and Delcroix, M. (2009). C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53, 1211–1218.

Quarck, R., Wynants, M., Verbeken, E., Meyns, B., and Delcroix, M. (2015). Contribution of inflammation and impaired angiogenesis to the pathobiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 46, 431–443.

Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., and Nicolls, M.R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 115, 165–175.

Rahman, A., and Fazal, F. (2009). Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 823–839.

Rahn, J.J., Chow, J.W., Horne, G.J., Mah, B.K., Emerman, J.T., Hoffman, P., and Hugh, J.C. (2005). MUC1 mediates transendothelial migration in vitro by ligating endothelial cell ICAM-1. *Clin. Exp. Metastasis* 22, 475–483.

Reesink, H.J., van der Plas, M.N., Verhey, N.E., van Steenwijk, R.P., Kloek, J.J., and Bresser, P. (2007). Six-minute walk distance as parameter of functional outcome after pulmonary endarterectomy for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 133, 510–516.

Regimbald, L.H., Pilarski, L.M., Longenecker, B.M., Reddish, M.A., Zimmermann, G., and Hugh, J.C. (1996). The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res.* 56, 4244–4249.

Rendas, A., and Reid, L. (1983). Pulmonary vasculature of piglets after correction of aorta-pulmonary shunts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 85, 911–916.

Rendas, A., Lennox, S., and Reid, L. (1979). Aorta-pulmonary shunts in growing pigs. Functional and structural assessment of the changes in the pulmonary circulation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 77, 109–118.

Riedel, M., Stanek, V., Widimsky, J., and Prerovsky, I. (1982). Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data. *Chest* 81, 151–158.

Riedel, M., Krönig, H., Schwarz, M.J., Engel, R.R., Sikorski, C., Kühn, K.-U., Behrens, S., Möller, H.-J., Ackenheil, M., and Müller, N. (2003). Investigation of the ICAM-1 G241A and A469G gene polymorphisms in schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 8, 257–258.

Robledo, O., Papaioannou, A., Ochietti, B., Beauchemin, C., Legault, D., Cantin, A., King, P.D., Daniel, C., Alakhov, V.Y., Potworowski, E.F., et al. (2003). ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur. J. Immunol.* 33, 1351–1360.

Roebuck, K.A. (1999). Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int. J. Mol. Med.* 4, 223–230.

Roebuck, K.A., and Finnegan, A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66, 876–888.

Rohde, L.E., Hennekens, C.H., and Ridker, P.M. (1999). Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1595–1599.

Ruf, A., and Patscheke, H. (1995a). Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin. Thromb. Hemost.* *21*, 146–151.

Ruf, A., and Patscheke, H. (1995b). Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. *Br. J. Haematol.* *90*, 791–796.

Russell, F.D., and Molenaar, P. (2000). The human heart endothelin system: ET-1 synthesis, storage, release and effect. *Trends Pharmacol. Sci.* *21*, 353–359.

Sakao, S., Hao, H., Tanabe, N., Kasahara, Y., Kurosu, K., and Tatsumi, K. (2011). Endothelial-like cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: crosstalk with myofibroblast-like cells. *Respir. Res.* *12*, 109.

Sanchez, O., Marcos, E., Perros, F., Fadel, E., Tu, L., Humbert, M., Dartevielle, P., Simonneau, G., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2007). Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *176*, 1041–1047.

Saouti, N., Morshuis, W.J., Heijmen, R.H., and Snijder, R.J. (2009). Long-term outcome after pulmonary endarterectomy for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a single institution experience. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* *35*, 947–952; discussion 952.

Sato, Y., and Rifkin, D.B. (1988). Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* *107*, 1199–1205.

Sato, H., Hall, C.M., Griffith, G.W., Johnson, K.F., McGillicuddy, J.W., Bartlett, R.H., and Cook, K.E. (2008). Large animal model of chronic pulmonary hypertension. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* *1992* *54*, 396–400.

Sato, K., Oka, M., Hasunuma, K., Ohnishi, M., Sato, K., and Kira, S. (1995). Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs. *Am. J. Physiol.* *269*, L668–L672.

Sato, M., Ando, M., Kaneko, K., Higuchi, Y., Kondo, H., Akita, K., Ishida, M., and Takagi, Y. (2013). Respiratory and hemodynamic changes in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension 1 year after pulmonary endarterectomy. *Ann. Vasc. Dis.* *6*, 578–582.

Savale, L., Tu, L., Rideau, D., Izziki, M., Maitre, B., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2009). Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir. Res.* *10*, 6.

Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., et al. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115, 2811–2821.

Shapiro, L., and Weis, W.I. (2009). Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003053.

Shi, W., Cernacek, P., Hu, F., and Michel, R.P. (1997). Endothelin reactivity and receptor profile of pulmonary vessels in postobstructive pulmonary vasculopathy. *Am. J. Physiol.* 273, H2558–H2564.

Shi, W., Giaid, A., Hu, F., and Michel, R.P. (1998). Increased reactivity to endothelin of pulmonary arteries in long-term post-obstructive pulmonary vasculopathy in rats. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 11, 189–196.

Shi, W., Hu, F., Kassouf, W., and Michel, R.P. (2000). Altered reactivity of pulmonary vessels in postobstructive pulmonary vasculopathy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 88, 17–25.

Shrikant, P., Chung, I.Y., Ballestas, M.E., and Benveniste, E.N. (1994). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 51, 209–220.

Simonneau, G., Robbins, I.M., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S.P., Gladwin, M.T., Jing, Z.-C., et al. (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S43–S54.

Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., et al. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, D34–D41.

Singh, I., Burnand, K.G., Collins, M., Luttun, A., Collen, D., Boelhouwer, B., and Smith, A. (2003). Failure of thrombus to resolve in urokinase-type plasminogen activator gene-knockout mice: rescue by normal bone marrow-derived cells. *Circulation* 107, 869–875.

Slight, S., Ganjam, V.K., Nonneman, D.J., and Weber, K.T. (1993). Glucocorticoid metabolism in the cardiac interstitium: 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in cardiac fibroblasts. *J. Lab. Clin. Med.* 122, 180–187.

Smith, K., Fox, S.B., Whitehouse, R., Taylor, M., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A.L. (1999). Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 10, 707–713.

Soon, E., Holmes, A.M., Treacy, C.M., Doughty, N.J., Southgate, L., Machado, R.D., Trembath, R.C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., et al. (2010). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122, 920–927.

Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Phan, S.H., Rollins, B.J., and Strieter, R.M. (1991). Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 9912–9918.

Staunton, D.E., Dustin, M.L., Erickson, H.P., and Springer, T.A. (1990). The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61, 243–254.

Steiner, M.K., Syrkina, O.L., Kolliputi, N., Mark, E.J., Hales, C.A., and Waxman, A.B. (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 104, 236–244, 28p following 244.

Stepniak, E., Radice, G.L., and Vasioukhin, V. (2009). Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002949.

Sugimura, K., Fukumoto, Y., Satoh, K., Nochioka, K., Miura, Y., Aoki, T., Tatebe, S., Miyamichi-Yamamoto, S., and Shimokawa, H. (2012). Percutaneous transluminal pulmonary angioplasty markedly improves pulmonary hemodynamics and long-term prognosis in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 76, 485–488.

Sullivan, C.C., Du, L., Chu, D., Cho, A.J., Kido, M., Wolf, P.L., Jamieson, S.W., and Thistlethwaite, P.A. (2003). Induction of pulmonary hypertension by an angiotensin II/TIE2/serotonin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12331–12336.

Suntharalingam, J., Goldsmith, K., van Marion, V., Long, L., Treacy, C.M., Dudbridge, F., Toshner, M.R., Pepke-Zaba, J., Eikenboom, J.C.J., and Morrell, N.W. (2008). Fibrinogen Aalpha Thr312Ala polymorphism is associated with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 31, 736–741.

Szmitko, P.E., Wang, C.-H., Weisel, R.D., Jeffries, G.A., Anderson, T.J., and Verma, S. (2003). Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation* 108, 2041–2048.

Tabatabai, E., Salimi, S., Mohammadoo-Khorasani, M., Yaghmaei, M., Mokhtari, M., Farajian Mashhadi, F., and Naghavi, A. (2014). KE and EE genotypes of ICAM-1 gene K469E polymorphism is associated with severe preeclampsia. *Dis. Markers* 2014, 124941.

Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

Takeichi, M., Hatta, K., Nose, A., and Nagafuchi, A. (1988). Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ. Dev. Off. J. Int. Soc. Dev. Biol.* 25 Suppl, 91–94.

Takeichi, M., Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A., and Matsunaga, M. (1989). Cadherin-mediated specific cell adhesion and animal morphogenesis. *Ciba Found. Symp.* 144, 243–249; discussion 250–254, 290–295.

Tanne, D., Haim, M., Boyko, V., Goldbourt, U., Reshef, T., Matetzky, S., Adler, Y., Mekori, Y.A., and Behar, S. (2002). Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke: a nested case-control study from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study cohort. *Stroke J. Cereb. Circ.* 33, 2182–2186.

Teven, C.M., Farina, E.M., Rivas, J., and Reid, R.R. (2014). Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes Dis.* 1, 199–213.

Thistlethwaite, P.A., Mo, M., Madani, M.M., Deutsch, R., Blanchard, D., Kapelanski, D.P., and Jamieson, S.W. (2002). Operative classification of thromboembolic disease determines outcome after pulmonary endarterectomy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 124, 1203–1211.

Thompson, K., and Rabinovitch, M. (1996). Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.* 166, 495–505.

Toyoda, Y., Thacker, J., Santos, R., Nguyen, D., Bhamra, J., Bermudez, C., Kormos, R., Johnson, B., Crespo, M., Pilewski, J., et al. (2008). Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann. Thorac. Surg.* 86, 1116–1122.

Trulock, E.P., Edwards, L.B., Taylor, D.O., Boucek, M.M., Keck, B.M., Hertz, M.I., and International Society for Heart and Lung Transplantation (2006). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report--2006. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 25, 880–892.

Tsuji, A., Ogo, T., Demachi, J., Ono, Y., Sanda, Y., Morita, Y., Fukuda, T., and Nakanishi, N. (2014). Rescue balloon pulmonary angioplasty in a rapidly deteriorating chronic thromboembolic pulmonary hypertension patient with liver failure and refractory infection. *Pulm. Circ.* 4, 142–147.

Tu, L., Dewachter, L., Gore, B., Fadel, E., Darteville, P., Simonneau, G., Humbert, M., Eddahibi, S., and Guignabert, C. (2011). Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 311–322.

Tuder, R.M., Cool, C.D., Geraci, M.W., Wang, J., Abman, S.H., Wright, L., Badesch, D., and Voelkel, N.F. (1999). Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1925–1932.



Tunariu, N., Gibbs, S.J.R., Win, Z., Gin-Sing, W., Graham, A., Gishen, P., and Al-Nahhas, A. (2007). Ventilation-perfusion scintigraphy is more sensitive than multidetector CTPA in detecting chronic thromboembolic pulmonary disease as a treatable cause of pulmonary hypertension. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 48, 680–684.

Valentin, T., Bonnet, D., and Guimbaud, R. (2011). Targeted therapy for dummies: anti-EGFR and anti-VEGF mechanism. *Hépatogastro Oncol. Dig.* 18, 4–16.

Varma, M.R., Varga, A.J., Knipp, B.S., Sukheepod, P., Upchurch, G.R., Kunkel, S.L., Wakefield, T.W., and Henke, P.K. (2003). Neutropenia impairs venous thrombosis resolution in the rat. *J. Vasc. Surg.* 38, 1090–1098.

Vestweber, D., and Blanks, J.E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79, 181–213.

Viswanatha, G.L., Shylaja, H., Sandeep Rao, K.S., Santhosh Kumar, V.R., and Jagadeesh, M. (2012). Hesperidin ameliorates immobilization-stress-induced behavioral and biochemical alterations and mitochondrial dysfunction in mice by modulating nitrenergic pathway. *ISRN Pharmacol.* 2012, 479570.

Vlahakes, G.J., Turley, K., and Hoffman, J.I. (1981). The pathophysiology of failure in acute right ventricular hypertension: hemodynamic and biochemical correlations. *Circulation* 63, 87–95.

Vlodavsky, I., Fridman, R., Sullivan, R., Sasse, J., and Klagsbrun, M. (1987). Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J. Cell. Physiol.* 131, 402–408.

Voraberger, G., Schäfer, R., and Stratowa, C. (1991). Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 147, 2777–2786.

Vuylsteke, A., Sharples, L., Charman, G., Kneeshaw, J., Tsui, S., Dunning, J., Wheaton, E., Klein, A., Arrowsmith, J., Hall, R., et al. (2011). Circulatory arrest versus cerebral perfusion during pulmonary endarterectomy surgery (PEACOG): a randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 378, 1379–1387.

Wagenvoort, C.A. (1995). Pathology of pulmonary thromboembolism. *Chest* 107, 10S – 17S.

Wagner, E.M., Sánchez, J., McClintock, J.Y., Jenkins, J., and Moldobaeva, A. (2008). Inflammation and ischemia-induced lung angiogenesis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294, L351–L357.

Wagner, E.M., Jenkins, J., Perino, M.G., Sukkar, A., and Mitzner, W. (2011). Lung and vascular function during chronic severe pulmonary ischemia. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 110, 538–544.

Wakefield, T.W., Strieter, R.M., Wilke, C.A., Kadell, A.M., Wroblewski, S.K., Burdick, M.D., Schmidt, R., Kunkel, S.L., and Greenfield, L.J. (1995). Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *15*, 258–268.

Wakefield, T.W., Linn, M.J., Henke, P.K., Kadell, A.M., Wilke, C.A., Wroblewski, S.K., Sarkar, M., Burdick, M.D., Myers, D.D., and Strieter, R.M. (1999). Neovascularization during venous thrombosis organization: a preliminary study. *J. Vasc. Surg.* *30*, 885–892.

Waltham, M., Burnand, K.G., Collins, M., and Smith, A. (2000). Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor are found in resolving venous thrombi. *J. Vasc. Surg.* *32*, 988–996.

Waltham, M., Burnand, K.G., Collins, M., McGuinness, C.L., Singh, I., and Smith, A. (2003). Vascular endothelial growth factor enhances venous thrombus recanalisation and organisation. *Thromb. Haemost.* *89*, 169–176.

Wanstall, J.C., Gambino, A., Jeffery, T.K., Cahill, M.M., Bellomo, D., Hayward, N.K., and Kay, G.F. (2002). Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* *55*, 361–368.

Watts, J.A., Marchick, M.R., and Kline, J.A. (2010). Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension. *J. Card. Fail.* *16*, 250–259.

Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.* *3*, cm1.

Welsh, C.H., Hassell, K.L., Badesch, D.B., Kressin, D.C., and Marlar, R.A. (1996). Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* *110*, 710–717.

Witkowska, A.M., and Borawska, M.H. (2004). Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur. Cytokine Netw.* *15*, 91–98.

Wójciak-Stothard, B., Williams, L., and Ridley, A.J. (1999). Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell Biol.* *145*, 1293–1307.

Wolf, M., Boyer-Neumann, C., Parent, F., Eschwege, V., Jaillet, H., Meyer, D., and Simonneau, G. (2000). Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* *15*, 395–399.

Woywodt, A., Streiber, F., de Groot, K., Regelsberger, H., Haller, H., and Haubitz, M. (2003). Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 206–210.

Wright, C.F., Christodoulou, J., Dobson, C.M., and Clarke, J. (2004). The importance of loop length in the folding of an immunoglobulin domain. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 17, 443–453.

Wu, X., and Reddy, D.S. (2012). Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* 134, 68–81.

Xia, Y., and Frangogiannis, N.G. (2007). MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 6, 101–107.

Xie, J., Li, R., Kotovuori, P., Vermot-Desroches, C., Wijdenes, J., Arnaout, M.A., Nortamo, P., and Gahmberg, C.G. (1995). Intercellular adhesion molecule-2 (CD102) binds to the leukocyte integrin CD11b/CD18 through the A domain. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 155, 3619–3628.

Yang, L., Froio, R.M., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Alon, R., and Luscinskas, F.W. (2005). ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106, 584–592.

Yao, W., Firth, A.L., Sacks, R.S., Ogawa, A., Auger, W.R., Fedullo, P.F., Madani, M.M., Lin, G.Y., Sakakibara, N., Thistlethwaite, P.A., et al. (2009). Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L870–L878.

Yihai, C. (2003). Angiogenesis inhibitors and their therapeutic potentials. *Adv. Exp. Med. Biol.* 532, 109–120.

Zabini, D., Heinemann, A., Foris, V., Nagaraj, C., Nierlich, P., Bálint, Z., Kwapiszewska, G., Lang, I.M., Klepetko, W., Olschewski, H., et al. (2014). Comprehensive analysis of inflammatory markers in chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients. *Eur. Respir. J.* 44, 951–962.

Zanjani, K.S. (2012). Platelets in pulmonary hypertension: a causative role or a simple association? *Iran. J. Pediatr.* 22, 145–157.

Zarbock, A., Lowell, C.A., and Ley, K. (2007). Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 26, 773–783.

**Titre : Mécanismes cellulaires et moléculaires dans la dysfonction endothéliale dans l'Hypertension Pulmonaire Post-Embolique (HPPE)**

**Mots clés :** Hypertension Pulmonaire Post-Embolique, dysfonction endothéliale, ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), thrombus, inflammation, angiogenèse

**Résumé :** L'Hypertension Pulmonaire Post-Embolique (HPPE) est une maladie rare et grave résultant d'une obstruction mécanique progressive des artères pulmonaires provoquant une augmentation progressive de la PAPm (>25 mmHg). Cette pathologie a un traitement chirurgical, l'endartériectomie pulmonaire. Bien que cette maladie ait un traitement, les mécanismes qui impliquent la formation et la persistance de ce séquestre, restent à ce jour inconnu. La pathogénèse de l'HPPE présente de grandes similitudes avec celles de l'HTAPi.

Ce travail a pu mettre en évidence le phénotype anormal de la cellule endothéliale provenant de séquestres de patients ayant

une HPPE ainsi que les anomalies moléculaires à l'origine de cette dysfonction. Plusieurs anomalies moléculaires sont à l'origine de ces perturbations fonctionnelles dont notamment une production et une libération anormale d'ICAM-1 et de FGF-2. Ce travail montre le rôle clé de la protéine ICAM-1 grâce à une boucle autocrine qui va maintenir cette dysfonction ainsi que l'association du génotype KE à la maladie (polymorphisme SNP Exon 6 E469K).

Ce travail montre également le rôle essentiel que joue la protéine FGF-2 et le recrutement de progéniteurs endothéliaux dans la néo-vascularisation observée dans les thrombus de patients souffrant d'HPPE.

**Title : Cellular and molecular mechanism in endothelial dysfunction in Chronic ThromboEmbolic Pulmonary Hypertension (CTEPH)**

**Keywords :** Chronic ThromboEmbolic Pulmonary Hypertension, endothelial cell dysfunction, ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), thrombus, inflammation, angiogenesis

**Abstract:** Chronic ThromboEmbolic Pulmonary Hypertension (CTEPH) is a rare and serious disease resulting from progressive mechanical obstruction of the pulmonary arteries causing a gradual increase in the mPAP (> 25 mmHg). This pathology has a surgical treatment: Pulmonary Endarterectomy. Mechanisms that involve the formation and persistence of thrombus leading to a fibrous vascular remodeling remain unknown. The pathogenesis of CTEPH is very similar to idiopathic PAH. This work has been able to demonstrate the abnormal phenotype of endothelial cells taken from unresolved fibrotic thrombus of CTEPH

and molecular anomalies in the origin of this dysfunction. Several molecular abnormalities are the cause of these functional disturbances including production and abnormal release of ICAM-1 and FGF-2. This work shows the key role of ICAM-1 protein through an autocrine loop maintains this dysfunction and the association of genotype KE disease (SNP Exon 6 E469K).

This work also showed the important role of FGF-2 protein and the recruitment of endothelial progenitor cells in neovascularization observed in thrombus of CTEPH patients.