



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS-SUD



ECOLE DOCTORALE 425 :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

DISCIPLINE :

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Laboratoire de Recherche Chirurgicale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue

ANNÉE 20013 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1286

THÈSE DE DOCTORAT

par

Julien GUIHAIRE

Remodelage du Ventricule Droit dans

I'Hypertension Pulmonaire Chronique Expérimentale

Date de soutenance : 17/09/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse:	Elie FADEL	PU-PH (Centre Chirurgical Marie Lannelongue)
Co-directeur de thèse:	Olaf MERCIER	PU-PH (Centre Chirurgical Marie Lannelongue)
Président du jury:	Philippe DARTEVELLE	PU-PH (Centre Chirurgical Marie Lannelongue)
Rapporteurs:	Robert NAEIJE	PU-PH (Université Libre de Bruxelles, Belgique)
	Jean-Philippe VERHOYE	PU-PH (Centre Hospitalier Universitaire de Rennes)
Examineurs:	Denis CHEMLA	PU-PH (Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre)
	Erwan FLECHER	PU-PH (Centre Hospitalier Universitaire de Rennes)
	Marc HUMBERT	PU-PH (Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre)
	François HADDAD	PHU (Université de Stanford, Etats Unis d'Amérique)
	Philippe HERVE	PH (Centre Chirurgical Marie Lannelongue)
Membres invités:	Sonja SCHREPFER	PU (Université de Hambourg, Allemagne)

REMERCIEMENTS

Au Pr Elie Fadel

Vous m'avez initié à la recherche fondamentale. Vous avez dirigé mes travaux de recherche avec disponibilité et enthousiasme scientifique. Vous me faites l'honneur de diriger cette thèse. Recevez ma gratitude et mon profond respect.

Au Pr Olaf Mercier

Tu as codirigé cette thèse. Tu m'as initié à l'expérimentation animale en me transmettant ta rigueur scientifique et ton souci permanent d'apporter des solutions aux cliniciens pour améliorer le quotidien des patients. Ta disponibilité et tes connaissances sont des atouts pour les étudiants que tu encadres. Reçois ma gratitude et mon amitié.

Au Dr François Haddad

Ta rencontre a été déterminante dans mes projets. Tu as renforcé mon intérêt scientifique et m'a permis de découvrir les secrets du ventricule droit. Tu es une référence internationale et c'est une grande fierté pour moi de pouvoir collaborer et discuter librement avec toi. Tu me fais l'honneur de juger ce travail. Reçois ma gratitude et mon amitié.

Au Pr Philippe Dartevelle

Vous êtes un expert du traitement chirurgical de l'hypertension pulmonaire. Vous m'avez encouragé dans mes projets expérimentaux en soutenant notamment ma mobilité en Allemagne. Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Recevez ma gratitude et mon profond respect.

Au Pr Jean-Philippe Verhoye

Vous avez toujours su m'encourager à élargir mes horizons, tant dans ma formation chirurgicale que scientifique. Sans votre soutien, tout ce parcours n'aurait pas été possible. Vous avez suivi pas à pas mes travaux, notamment en vous déplaçant sur les lieux où se déroulaient les expérimentations. Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Recevez ma gratitude et mon

profond respect.

Au Pr Robert Naeije,

Vous êtes un expert international de la physiologie circulatoire cardio-pulmonaire. Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Recevez ma gratitude et mon profond respect.

Au Pr Denis Chemla

Vos travaux sur la physiologie circulatoire dans l'hypertension pulmonaire sont cités en référence. Vous avez spontanément accepté de juger ce travail et je vous en remercie. Recevez ma gratitude et mon profond respect.

Au Pr Erwan Flécher

Tu m'as initié à la chirurgie cardiaque et à la communication médicale avec une grande disponibilité. Tu as toujours pris le temps de lire mes travaux et de me transmettre tes critiques avisées. Tu me fais l'honneur de juger ce travail. Reçois ma gratitude et mon amitié.

Au Pr Marc Humbert

Vous êtes un expert international des pathologies vasculaires pulmonaires. Vous m'avez permis de collaborer avec votre unité de recherche fondamentale sur l'hypertension pulmonaire. Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Recevez ma gratitude et mon profond respect.

Au Dr Philippe Hervé

Vos connaissances de la circulation pulmonaire et vos encouragements nous ont permis d'avancer dans nos projets expérimentaux. Vous me faites l'honneur de juger de travail. Recevez ma gratitude et mon amitié.

Au Pr Alain Leguerrier

Vous avez accepté de me former à la chirurgie cardio-thoracique et je suis fier d'être votre élève. Vous m'avez toujours encouragé dans mes projets. Sans votre soutien académique, je n'aurai

sans doute pas fait le même parcours.

Au Pr Sonja Schrepfer

Sie haben mir in Ihrem Forschungslaboratorium während eines Jahres angenommen und haben Sie haben mir erlaubt, ein experimentelles Projekt von großer Bedeutung zu führen. Sie sind eine internationale Expertin in den Zelltherapien und im Immunobiologie der Transplantation. Sie haben an mich Ihre methodologische Rauheit und Ihren wissenschaftlichen Enthusiasmus weitergegeben. Bekommen Sie meine tiefe Dankbarkeit.

Je tiens à remercier tout particulièrement pour leur aide précieuse:

- les Dr David Boulate et Pierre-Emmanuel Noly pour leur collaboration scientifique
- M. Benoît Decante pour ses qualités de « *Lab manager* »
- le Dr André Capderou pour m'avoir initié avec pédagogie à l'acquisition et à l'interprétation des boucles pression-volume du ventricule droit
- toute l'équipe du *Laboratoire de Recherche Chirurgicale* du Centre Chirurgical Marie Lannelongue, en particulier Anaëlle, Julie, Florence, Bruno et Frédéric
- Mandy Stubbendorff, Ryo Itagaki, Dong Wang, Daniel Matutat, Christiane Pahrman, Florian Weinberger et Simon Pecha et toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu durant mon année au sein du *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* de l'université de Hambourg

A Cécile et à nos deux enfants Lilly et Joshua qui m'ont suivi et supporté au cours de ce parcours scientifique de 4 années depuis Rennes jusqu'à Hambourg, en passant par Paris. Merci.

LISTE DES ABREVIATIONS

AP	artère pulmonaire
PAP	pression artérielle pulmonaire
VD	ventricule droit
VG	ventricule gauche
HTP	hypertension pulmonaire
HYPPE	hypertension pulmonaire post-embolique
IRM	imagerie par résonnance magnétique
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
RVFAC	right ventricular fractional area change
IPMVD	index de performance myocardique du ventricule droit
VES	volume d'éjection systolique
Ees	élastance ventriculaire télésystolique
Ea	élastance artérielle
POG	pression dans l'oreillette gauche
SRAA	système rénine angiotensine aldostérone
ATP	adénosine triphosphate
SW	stroke work

RESUME

La fonction du ventricule droit est un déterminant majeur de la capacité fonctionnelle et du pronostic dans l'hypertension pulmonaire. La survenue dans ce contexte d'une insuffisance cardiaque droite requérant un support inotrope est associée à un taux de mortalité supérieur à 40%. Les déterminants cellulaires et moléculaires du découplage entre le cœur droit et la circulation artérielle pulmonaire sont méconnus, d'autant qu'il existe une grande hétérogénéité fonctionnelle parmi les patients soumis au même niveau de résistances vasculaires pulmonaires.

Dans une première étude expérimentale, nous avons mis évidence à partir d'un modèle porcin d'hypertension pulmonaire chronique que les indices fonctionnels systoliques du ventricule droit mesurés en échocardiographie sont davantage corrélés au couplage ventriculo-artériel qu'à la performance contractile propre du ventricule droit. La réponse du ventricule droit à l'exercice ou à un stress pharmacologique a été peu documentée jusqu'à présent dans l'hypertension pulmonaire.

A partir de notre modèle porcin, nous avons montré que l'altération de la réserve contractile du ventricule droit est fortement associée au découplage ventriculo-artériel. La réserve contractile pourrait être un marqueur sensible et précoce de dysfonction ventriculaire droite. Dans une troisième étude, nous montrons la relation forte entre le couplage ventriculo-artériel et la plasticité hémodynamique, fonctionnelle et moléculaire du ventricule droit dans un contexte de surcharge de pression chronique. Les variations d'expression de l'isoforme β de la chaîne légère de la myosine cardiaque pourraient déterminer l'efficacité du travail cardiaque droit. Nous avons par ailleurs constaté expérimentalement chez le rat que le remodelage géométrique et fonctionnel du ventricule droit en condition de surcharge barométrique chronique est associé à une infiltration macrophagique du muscle cardiaque droit.

Nos résultats physiopathologiques pourraient permettre une meilleure stratification des patients souffrant d'hypertension pulmonaire chronique. Ces mécanismes pourraient par ailleurs constituer autant de cibles thérapeutiques pour optimiser la fonction cardiaque droite lorsque la postcharge du ventricule droit n'est pas complètement corrigée, d'autant que les thérapies vaso-actives pulmonaires usuelles auraient des effets directs controversés sur le remodelage du ventricule droit.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

..... p. 11

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSUFFISANCE VENTRICULAIRE DROITE : CONNAISSANCES ACTUELLES

1. Embryologie et anatomie du ventricule droit

..... p. 17

2. Physiologie du ventricule droit

..... p. 20

3. Hémodynamique du ventricule droit

a) Précharge du ventricule droit

..... p. 22

b) Postcharge du ventricule droit

..... p. 23

c) Couplage ventriculo-artériel

1) Généralités

..... p. 25

2) Aspects énergétiques

..... p. 28

3) Applications cliniques

..... p. 28

4. Métabolisme du ventricule droit

a) Substrats énergétiques

..... p. 31

b) Résistance à l'ischémie

..... p. 31

5. Physiologie ventriculaire droite dans l'hypertension pulmonaire chronique

a) Remodelage géométrique

..... p. 33

b) Remodelage métabolique et énergétique

..... p. 38

6. Inflammation, hypertension pulmonaire et remodelage ventriculaire

..... p. 41

MATERIEL ET METHODES

1. Modèles animaux de surcharge chronique de pression dans le ventricule droit

<i>a) Règlements sur l'expérimentation animale</i>	p. 44
<i>b) Généralités sur les modèles expérimentaux de remodelage ventriculaire droit</i>	p. 44
<i>c) Modèle porcin d'hypertension pulmonaire post-embolique (HYPPE)</i>	p. 48
<i>c) Modèle de reperfusion du poumon gauche chez le porc</i>	p. 51
<i>d) Modèle d'hypertension pulmonaire angioproliférative chez le rat</i>	p. 52

2. Analyse échocardiographique du ventricule droit chez l'animal

<i>a) Echographies et protocoles d'acquisition</i>	p. 67
<i>b) Mesure des indices géométriques et fonctionnels</i>	p. 67

3. Cathétérisme cardiaque droit

	p. 70
--	-------

4. Boucles pression-volume du ventricule droit

<i>a) Technique de conductance chez le porc</i>	p. 72
<i>b) Technique d'admittance chez le rat</i>	p. 75

5. Histologie

<i>a) Morphométrie et immunofluorescence sur le ventricule droit chez le porc et le rat</i>	p. 78
<i>b) Morphométrie et immunohistochimie des artères pulmonaires chez le rat</i>	p. 79

6. Biologie moléculaire

<i>a) Sélection et préservation des tissus d'intérêt</i>	p. 81
<i>b) Extraction des ARN totaux</i>	p. 81
<i>c) Transcription inverse</i>	p. 81

d) Réaction de polymérisation quantitative en chaîne en temps réel (RtqPCR)

.....	p. 81
<u>7. Analyses statistiques</u>	
.....	p. 82
TRAVAUX DE RECHERCHE	
<u>1. Hypothèses</u>	
.....	p. 84
<u>2. Première étude</u>	
.....	p. 86
<u>3. Deuxième étude</u>	
.....	p. 99
<u>4. Troisième étude</u>	
.....	p. 130
<u>5. Quatrième étude</u>	
.....	p. 142
<u>6. Cinquième étude</u>	
.....	p. 156
<u>7. Etudes en cours et perspectives : l'immunomodulation par les macrophages régulateurs</u>	
.....	p. 165
REFERENCES	
.....	p. 169

INTRODUCTION

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare entraînant le remodelage progressif puis la dysfonction du cœur droit.¹ La réponse du ventricule droit à l'augmentation de sa postcharge est le principal facteur déterminant la survenue des symptômes chez les patients souffrant d'HTP. L'insuffisance cardiaque droite marque ainsi un tournant évolutif majeur dans l'histoire de cette maladie. L'altération du débit cardiaque et l'élévation de la pression veineuse centrale sont associées à une surmortalité dans l'HTP.^{2, 3} Cependant la valeur pronostique de la fonction ventriculaire droite a longtemps été sous-estimée, tandis que les études cliniques et scientifiques se sont longtemps focalisées sur la circulation pulmonaire comme cible thérapeutique de l'HTP. Or dès le début du XVII^e siècle, Sir William Harvey s'interrogeait sur le rôle de la fonction pulsatile du ventricule droit (VD).⁴ Le VD ne pouvait être selon lui qu'un simple « conduit nourricier » pour les poumons. Pourtant de nombreux travaux expérimentaux vont se succéder pour démontrer que le VD n'est pas indispensable au maintien d'une hémodynamique efficace. Starr et al, puis Kagan et al vont ainsi successivement montrer que la perte de fonction du VD ne s'associe pas nécessairement à un syndrome congestif chez le chien après cautérisation de la paroi libre du VD.^{5, 6} Par la suite, les excellents résultats à court et moyen termes de l'intervention de Fontan pour pallier les ventricules uniques congénitaux sous-tendaient que la fonction ventriculaire droite n'était pas indispensable à la vie.⁷ La publication des résultats à long terme après création d'un shunt cavo-pulmonaire a cependant révélé par la suite les complications potentielles sur l'hémodynamique pulmonaire de cette « circulation de Fontan » avec notamment une altération des performances cardiaques à l'exercice par limitation de l'augmentation de la précharge ventriculaire et de la fréquence cardiaque à l'effort.⁸ Au cours des années 2000, l'étude de la physiologie ventriculaire droite va connaître un nouvel essor comme en attestent la publication de revues complètes sur la question dans des journaux internationaux de référence telles que *European Heart Journal* ou *Circulation*.⁹⁻¹² Ces articles soulignent notamment la nécessité d'approfondir les recherches dans la compréhension physiologique et moléculaire de l'insuffisance ventriculaire droite dans l'HTP chronique. Les mécanismes de dysfonction ventriculaire gauche ont trop longtemps été translatés au cœur droit pour expliquer la dysfonction du VD dans les maladies cardio-respiratoires chroniques. Or l'embryogénèse, la géométrie et les propriétés biomécaniques du VD sont distinctes de celles du ventricule gauche.¹³ Les récents

progrès des investigations non-invasives ont par ailleurs permis un regain d'intérêt pour l'analyse de la physiopathologie de la dysfonction ventriculaire droite.

Le VD est un acteur majeur de la physiologie circulatoire comme en atteste son rôle pronostique dans de nombreuses situations cliniques telles que l'HTP chronique, les cardiopathies congénitales, ou bien encore la transplantation cardiaque et l'assistance circulatoire mécanique. La fonction ventriculaire droite est également un facteur pronostique majeur dans le syndrome de détresse respiratoire aigu de l'adulte et dans l'insuffisance cardiaque gauche.¹² La physiologie ventriculaire droite peut être perturbée au décours immédiat d'une chirurgie cardiaque. L'insuffisance cardiaque droite aiguë survient chez environ 0,1% des patients post-cardiotomie et 2 à 3% après transplantation cardiaque.¹⁴ Elle est surtout associée à une morbi-mortalité opératoire élevée, jusqu'à 75% au décours d'une chirurgie cardiaque. Si la dysfonction ventriculaire pré-opératoire participe généralement peu, l'ischémie myocardique durant un temps de clampage long par défaut de protection myocardique est en revanche source de lésions pouvant conduire à l'insuffisance cardiaque droite aiguë. D'autres facteurs peuvent être incriminés tels que la perte de la synchronisation atrioventriculaire, les embolies coronaires, l'hypertension pulmonaire pré-existante, la surcharge de volume du VD avec ou sans régurgitation tricuspide, l'obstruction dynamique de la chambre de chasse du VD par effet combiné de l'hypovolémie et des inotropes, et enfin les lésions d'ischémie-reperfusion coronaire.¹⁵

Grâce aux progrès réalisés dans la prise en charge des cardiopathies congénitales au cours des cinq dernières décennies, la majorité des enfants survivent aujourd'hui à l'âge adulte. La population d'adultes porteurs de cardiopathies congénitales croît de 5% par an.^{16, 17} Parmi les malformations pouvant affecter le cœur droit, on retrouve les communications inter-atriales, la tétralogie de Falot, la sténose pulmonaire congénitale, la maladie d'Ebstein, ou bien encore la dysplasie arythmogène du VD. Lorsqu'une reconstruction anatomique est impossible face à une malformation complexe, les corrections chirurgicales palliatives peuvent exposer à long terme les patients à la survenue d'une insuffisance ventriculaire droite irréversible. C'est le cas notamment lorsque le VD est laissé en position systémique dans certaines transpositions des gros vaisseaux. Parfois c'est la correction chirurgicale elle-même qui s'associe au développement progressif d'une dysfonction ventriculaire droite comme dans les tétralogies de Falot opérées avec régurgitation

pulmonaire résiduelle.¹⁸

Face au manque relatif de greffons et grâce aux progrès technologiques, le traitement de l'insuffisance cardiaque terminale par assistance circulatoire mécanique de longue durée connaît un essor considérable en attente de transplantation cardiaque depuis une dizaine d'années. Elle trouve également sa place chez les patients non éligibles pour la greffe, avec l'implantation dans la plupart des cas de dispositifs d'assistance monoventriculaire gauche. L'évaluation de la fonction du VD est déterminante avant l'implantation puisque 15 à 44% des patients sous assistance monoventriculaire gauche vont développer une insuffisance ventriculaire droite malgré l'expérience croissante des équipes dans la gestion de ces machines.¹⁹ Cette complication hémodynamique double la mortalité à 30 jours, majore les délais de réhabilitation, les besoins transfusionnels ainsi que le risque de défaillance multiviscérale.²⁰

Dans ce travail de thèse, nous avons tenté de reconsidérer les propriétés physiopathologiques du ventricule droit dans l'HTP sans le dissocier de la circulation pulmonaire. Si les progrès pharmacologiques majeurs dans l'HTP ces deux dernières décennies ont permis d'améliorer la qualité de vie des patients, le pronostic de la maladie reste sombre, principalement par la survenue inéluctable d'une insuffisance cardiaque droite non réversible, hormis dans les situations où un traitement chirurgical permet de réduire durablement la postcharge du VD (endartériectomie pulmonaire, transplantation bi-pulmonaire). Les molécules vaso-actives sur la circulation pulmonaire (analogues de la prostacycline, inhibiteurs de phosphodiesterase 5 et antagonistes des récepteurs de l'endothéline) ont un effet limité sur l'hémodynamique pulmonaire, si bien que le travail cardiaque du VD reste élevé. A la phase initiale du traitement, ces médicaments réduisent efficacement les résistances vasculaires pulmonaires et la pression artérielle pulmonaire moyenne ; à un stade plus avancé de la maladie, ces drogues vont augmenter le débit cardiaque sans avoir d'effet sur les pressions pulmonaires, ce qui aboutit à la dégradation progressive de la fonction ventriculaire droite.²¹ Par ailleurs ces traitements ont essentiellement un tropisme pour la circulation pulmonaire, tandis que leurs effets directs sur le myocarde ventriculaire droit sont controversés.^{22, 23} Nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'adaptation et aux moyens d'évaluation du cœur droit à partir de modèles

expérimentaux d'HTP chronique sur l'animal. En gardant à l'esprit que l'HTP est une maladie cardiopulmonaire chronique, nous avons respecté le concept d'unité physiologique cœur-poumon telle que décrite initialement par Sir William Harvey. Notre hypothèse est qu'il pourrait y avoir un grand bénéfice à préserver la fonction ventriculaire droite si les patients souffrant d'HTP recevaient précocement une thérapie ciblant à la fois les lésions vasculaires pulmonaires et le remodelage myocardique inadapté.

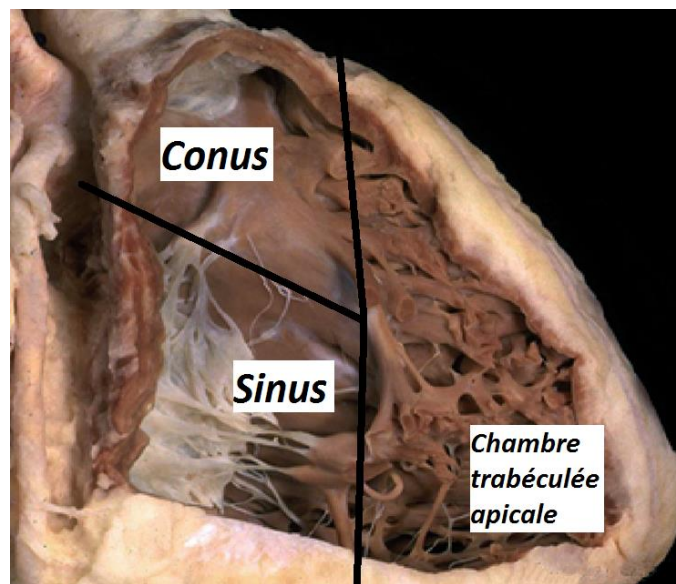
PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INSUFFISANCE VENTRICULAIRE DROITE :
CONNAISSANCES ACTUELLES

1. EMBRYOLOGIE ET ANATOMIE DU VENTRICULE DROIT

Le développement embryologique du VD a longtemps été considéré comme dérivant du champ cardiaque primaire.²⁴ Récemment, des travaux expérimentaux ont mis en évidence le rôle du mésoderme pharyngé dans la genèse du champ cardiaque secondaire à l'origine du pôle artériel et de la chambre de chasse du VD.²⁵⁻²⁸ Le VD ne partage donc pas la même origine embryologique que le ventricule gauche (VG). Le VD et sa chambre de chasse (infundibulum pulmonaire) dérivent du champ cardiaque secondaire, tandis que les oreillettes et le VG dérivent du champ cardiaque primaire. Le sinus ou chambre d'entrée du VD dérive de la portion ventriculaire du tube cardiaque primitif, tandis que l'infundibulum ou chambre de chasse dérive du conus cordis, structure distincte du ventricule commun.¹³ De cette découverte est né un regain d'intérêt pour l'étude de la génétique et de la physiologie du VD, remettant en cause la translation pour le VD des mécanismes physiopathologiques du cœur gauche.

Le VD présente 3 faces (inférieure concave, interne convexe et antérieure) et se décompose d'après Lillehei en une chambre d'entrée ou sinus comprenant la valve tricuspide, les muscles papillaires et la chordae tendinae ; une chambre trabéculée apicale ; et enfin une chambre de chasse ou conus ou infundibulum présentant une paroi myocardique interne lisse (*Figure 1*).^{29, 30} Trois bandelettes musculaires sont remarquables dans la cavité du VD : la bandelette septomarginale, la bandelette pariétale (ou éperon de Wolff) et la bandelette modératrice (ou bandelette ansiforme). La bande pariétale délimite avec le septum du conus la crista supraventricularis, tandis que la bandelette septomarginale s'étend en inférieur et se continue avec la bandelette modératrice. Les principales différences structurelles du VD et du VG sont listées dans le *Tableau 1*.

Figure 1. Macroscopie du ventricule droit en coupe sagittale représentant ses 3 chambres : la chambre d'entrée ou sinus, la chambre trabéculée apicale et la chambre de chasse ou conus.



Dans le réseau coronaire droit dominant (80% des cas), la paroi libre antérieure du VD est perfusée par des branches marginales de l'artère coronaire droite, tandis que les artères interventriculaires antérieure et postérieure vascularisent respectivement la paroi antéro-septale et la paroi inférieure du VD. L'artère infundibulaire naît précocement du segment proximal de l'artère coronaire droite (voire même possède un ostium propre dans 30% des cas), expliquant la préservation de la fonction infundibulaire dans les infarctus inférieurs par occlusion aiguë de l'artère coronaire droite puisque les occlusions ostiales sont rares.¹¹ Le flux dans l'artère coronaire droite proximale est systolo-diastolique en l'absence d'hypertrophie ventriculaire droite, tandis que la perfusion coronaire est principalement diastolique dans les segments 2 et 3 ainsi que dans les branches marginales du bord droit. Le drainage veineux du VD s'effectue majoritairement (70%) via le sinus coronaire et dans une moindre mesure (30%) directement dans le VD et l'oreillette droite par les veines de Thebesius.

Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques morphologiques du ventricule droit et du ventricule gauche chez l'adulte.

	Ventricule droit	Ventricule gauche
Forme :		
- <i>section coronale</i>	Triangulaire	Elliptique
- <i>section axiale</i>	Croissant	Circulaire
Volume (mL/m ²)	75 ± 13 *	66 ± 12 *
Masse (g/m ²)	26 ± 5 *	87 ± 12 *
Epaisseur (mm)	2 à 5 *	7 à 11 *
Valve atrio-ventriculaire	Tricuspidé	Bicuspidé
	A distance de la valve artérielle	Proche de la valve artérielle
Muscles papillaires	3 ou + ; insertions possibles sur le septum interventriculaire	2
Fibres myocardiques	Fibres profondes (base vers apex) + fibres superficielles (circonférentielles en continuité avec celles du VG)	Fibres profondes et superficielles + fibres moyennes (contraction radiale)

* d'après Haddad F. et al ¹¹

2. PHYSIOLOGIE DU VENTRICULE DROIT

In utero, la paroi du VD est aussi épaisse que celle du VG car les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) sont élevées alors que les résistances vasculaires systémiques sont basses afin que le sang soit envoyé vers la circulation placentaire via le canal artériel. A la naissance, les artères pulmonaires (AP) se dilatent et les RVP chutent brutalement, le canal artériel et le foramen ovale se ferment. La paroi libre du VD va progressivement s'amincir, tandis que la compliance augmente en parallèle du changement géométrique. Avec l'âge, la rigidité des AP tend à augmenter les RVP sans altérer la fonction systolique ventriculaire droite. La fonction diastolique se modifie en revanche avec une diminution du remplissage précoce et un ralentissement des vitesses diastoliques.¹¹

Contrairement à la circulation systémique, les résistances vasculaires et la pression artérielle pulmonaires sont faibles, inférieures de l'ordre d'1/6 aux valeurs systémiques. La pression artérielle pulmonaire (PAP) pulsée est donc inférieure, mais la distensibilité est augmentée. A l'inverse de la circulation systémique, la rigidité pariétale des vaisseaux pulmonaires n'augmente pas de la proximalité vers la distalité.

La contraction du VD est séquentielle depuis le sinus jusqu'au conus (25 à 30 ms de délai). Elle s'établit en 2 temps, d'abord de l'anneau tricuspide vers l'apex, puis de l'apex vers la valve pulmonaire selon un mouvement péristaltique. Une première phase de raccourcissement actif des myofibrilles profondes permet le rapprochement de la paroi libre et du septum interventriculaire. Contrairement au VG, cette contraction radiaire joue un rôle mineur dans la fonction de pompe du VD. C'est davantage le raccourcissement des fibres longitudinales le long de l'axe base-apex qui participe à la contraction du VD. En fin de systole, les propriétés résistives du VD et la faible impédance de la circulation pulmonaire permettent une éjection passive.¹³ La participation relative des composantes longitudinale et radiaire dans la contraction physiologique du VD est de l'ordre 80% / 20%.^{31, 32} Il existe par ailleurs une participation non négligeable des fibres superficielles communes au VG pour tracter la paroi libre : en l'absence d'insuffisance cardiaque, la contraction du VG participerait ainsi à hauteur de 20 à 40% dans la systole du VD. Avec le septum

interventriculaire, les myofibrilles superficielles constituent le second élément anatomique essentiel de l'interdépendance ventriculaire systolique.¹¹ De nombreux travaux expérimentaux sur cœur isolé mettent en évidence l'interaction systolique VD/VG : l'optimisation de la performance du VG majore ainsi la pression générée par le VD ; à l'inverse, en cas d'ischémie de la paroi libre du VD ou en cas de surcharge de pression aiguë dans le VD, la performance de la pompe ventriculaire gauche est altérée.^{13, 33} Toutes ces études sont limitées par l'ouverture du péricarde. Or le sac péricardique participe à l'interdépendance diastolique, surtout remarquable en cas de surcharge aiguë de pression ou de volume dans le VD.³⁴ Au décours d'une chirurgie cardiaque, l'ouverture du péricarde et sa fermeture incomplète, voire absente dans certains cas, peut être un cofacteur de dysfonction ventriculaire droite par altération de l'interdépendance ventriculaire, notamment sur le versant diastolique.¹⁵

Le conus ou infundibulum pulmonaire a une fonction essentielle dans la physiologie du VD. Sa forme cylindrique et sa face interne lisse lui confèrent des propriétés résistives qui « protègent » la circulation pulmonaire de la transmission des pressions générées par la pompe ventriculaire droite. L'épaisseur de la paroi infundibulaire constituée par des myofibrilles circonférentielles organisées en parallèle, réduit le diamètre interne comparativement au sinus. Cette géométrie explique ainsi que le stress pariétal soit toujours plus faible au niveau du conus quelle que soit la valeur des pressions dans le VD.¹³

3. HEMODYNAMIQUE DU VENTRICULE DROIT

La performance myocardique est déterminée par 4 facteurs: la précharge, la postcharge, la fréquence et le rythme cardiaque, et enfin l'inotropisme ou contractilité. Le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque, habituellement utilisés pour évaluer la fonction cardiaque, sont des variables dépendantes de ces facteurs.

a) Précharge du ventricule droit

Physiologiquement, la pression diastolique du VD est comprise entre 0 et 8 mm Hg.³⁵ Le VD est exposé à de fréquentes variations du retour veineux, principalement influencé par la cinétique ventilatoire, et par les conditions pathologiques affectant les conditions de charge. Le VD présente une compliance élevée en raison de sa géométrie plus large et de sa paroi libre, quatre fois plus fine que celle du VG. Sur le plan ultrastructurel, les sarcomères du VD sont identiques à ceux retrouvés dans le myocarde du VG. En revanche leur réponse à la pression de remplissage est différente. Le sarcomère du VD a besoin d'une pression plus faible pour atteindre la même longueur que le sarcomère du VG.¹³ En conséquence, le VD s'adapte mieux à une surcharge chronique de volume qu'à une surcharge de pression.³⁵ Si l'on considère le cœur gauche, l'élévation de la précharge améliore la contraction myocardique.³⁶ La loi de Frank-Starling caractérise cette augmentation du travail ventriculaire externe, ou travail fourni lors de l'éjection en réponse à l'élévation du stress pariétal. En raison d'une faible relation entre la surface et le volume du ventricule droit, le travail cardiaque externe recruté par la précharge est faible au niveau du VD.³⁷ Le mécanisme de Frank-Starling n'interviendrait en compensation pour optimiser la contraction myocardique qu'en cas de dilatation significative du VD.³⁵ La précharge est également un important déterminant de la perfusion myocardique du VD en condition physiologique. Des pressions de remplissage élevées pourraient perturber la perfusion myocardique du VD par diminution de la réserve vasodilatatrice coronaire. C'est la raison pour laquelle une expansion volumique excessive peut être délétère pour la fonction ventriculaire droite, en particulier s'il existe une coronaropathie significative associée.³⁸

En cas d'ischémie ventriculaire droite isolée, l'altération brutale de la contractilité ne se traduit le plus souvent pas par une insuffisance cardiaque droite. Une augmentation modérée de la pression veineuse centrale est en effet suffisante pour maintenir un débit à travers la circulation pulmonaire et éviter l'apparition de signes congestifs périphériques.³⁵ Un débit cardiaque de 6 L/min est ainsi préservé au repos malgré l'absence de contractilité ventriculaire droite à condition que la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) et que la pression dans l'oreillette gauche (POG) ne dépassent pas 14 et 8 mm Hg respectivement. Cette adaptation « passive » n'est donc possible que si les RVP sont faibles.³⁹

b) Postcharge du ventricule droit

La circulation pulmonaire est caractérisée par un débit élevé, de faibles résistances et une compliance élevée. Les RVP sont exprimées en unités Wood et sont calculées par le ratio du gradient trans-pulmonaire (PAPm - POG) sur le débit cardiaque. Les RVP sont habituellement assimilées à la postcharge du VD en conditions normales car elles sont facilement mesurables en pratique clinique. Les RVP ne représentent cependant que la composante résistive de la charge hydraulique pulmonaire, si bien que les RVP isolées sous-estiment la postcharge du VD en négligeant la pulsatilité du flux sanguin et les ondes de réflexion du sang dans la circulation pulmonaire. Or les maladies vasculaires pulmonaires perturbent l'ensemble des éléments définissant l'hémodynamique pulmonaire.

Les propriétés visco-élastiques des vaisseaux pulmonaires sont un déterminant majeur de la charge hydraulique pulmonaire. L'activation des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires au sein des AP proximales pourrait optimiser le transfert d'énergie depuis le VD jusqu'à la circulation pulmonaire en réponse à une augmentation brutale de la postcharge. Grignola et al ont montré que l'activation des cellules musculaires lisses vasculaires pouvait améliorer le transfert d'énergie depuis le VD vers la circulation pulmonaire en cas d'HTP. Il s'agit d'un mécanisme pouvant permettre au VD de s'adapter à une HTP aiguë en réduisant le travail ventriculaire externe.⁴⁰

La rigidité vasculaire peut participer à l'élévation de la postcharge du VD en cas lésions

vasculaires pulmonaires dans l'HTP. Les variations de pulsatilité du flux sanguin de même que les variations de compliance de la circulation pulmonaire doivent en conséquence être considérées pour estimer avec précision la postcharge du VD. La composante pulsatile de la charge vasculaire pulmonaire est déterminée à la fois par la performance contractile du VD, mais aussi par la compliance artérielle pulmonaire définie par l'impact dynamique du flux sanguin sur les parois vasculaires pulmonaires. La compliance artérielle pulmonaire peut ainsi être calculée comme le ratio de la pression artérielle pulmonaire pulsée sur le volume d'éjection du VD.

L'impédance artérielle pulmonaire est probablement la mesure la plus précise de la postcharge ventriculaire droite. Elle inclut en effet à la fois la composante statique et la composante dynamique de la charge hydraulique pulmonaire. L'impédance pourrait être un meilleur indice prédictif de survie à long terme que les RVP dans l'HTP.^{41, 42} Sa définition dans le domaine fréquentiel limite cependant son application clinique en routine. Les modèles à trois ou quatre éléments de Windkessel prennent en compte les RVP et la compliance, mais pas les ondes de réflexion.⁴² Sunagawa a caractérisé la charge artérielle systémique dans le domaine temporel en la nommant élastance artérielle effective (Ea).⁴³ Ea est ainsi définie par un changement de pression en réponse à une variation de volume. Elle représente la charge vasculaire effective que le ventricule doit vaincre pendant l'éjection. L'élastance artérielle pulmonaire peut être déterminée à partir de l'analyse des boucles pression-volume ou bien estimée par le ratio de la pression téléstolique (PTS) du VD sur le volume d'éjection systolique (VES).

$$Ea = PTS / VES$$

Morimont et al ont montré une forte corrélation entre ce ratio et la valeur d'Ea pour des conditions de charge pulmonaire très variées.⁴⁴ Les variations dynamiques ainsi que les changements d'onde de réflexion du flux sanguin pulmonaire ont été rapportés chez les patients souffrant d'HTP chronique.⁴⁵ Une diminution significative de la compliance vasculaire pulmonaire

serait autant impliquée que l'augmentation de E_a dans l'installation de l'insuffisance ventriculaire droite au cours de l'HTP.⁴⁶ La perturbation de pulsatilité du flux artériel pulmonaire telle que définie par la performance contractile du VD et par la compliance artérielle pulmonaire, pourrait en partie expliquer l'inefficacité du couplage ventriculo-artériel à un stade avancé de l'HTP. Les changements de pulsatilité de la postcharge ventriculaire droite entraîneraient le remodelage progressif et la dysfonction du VD.

c) Couplage ventriculo-artériel

1. Généralités

La performance ventriculaire est dépendante de l'interaction entre la pompe cardiaque et la circulation d'aval. L'énergie de propulsion de la masse sanguine est en effet fournie par le ventricule, tandis que les propriétés élastiques et résistives du réseau vasculaire fixent les contraintes de travail de la pompe cardiaque. L'analyse de la performance ventriculaire doit donc prendre en considération les propriétés intrinsèques de la circulation d'aval. Cette interaction, appelée couplage ventriculo-artériel, va générer le volume d'éjection ventriculaire et la pression d'éjection. Ce concept initialement élaboré par Sunagawa pour le cœur gauche, peut s'appliquer à l'unité cardiopulmonaire.⁴⁷ Cette analyse repose sur le concept que le ventricule et l'arbre vasculaire sont des cavités aux propriétés élastiques, compliantes et résistantes variables qui peuvent être résumées par des équations algébriques.⁴⁸

Le ventricule est une cavité à élastance variable, l'élastance étant le reflet des variations de pression en réponse aux variations de volume. L'élastance télésystolique ventriculaire (E_{es}) est définie par l'équation suivante :

$$E_{es} = [P(t) / (V(t) - V^0)]_{\max}$$

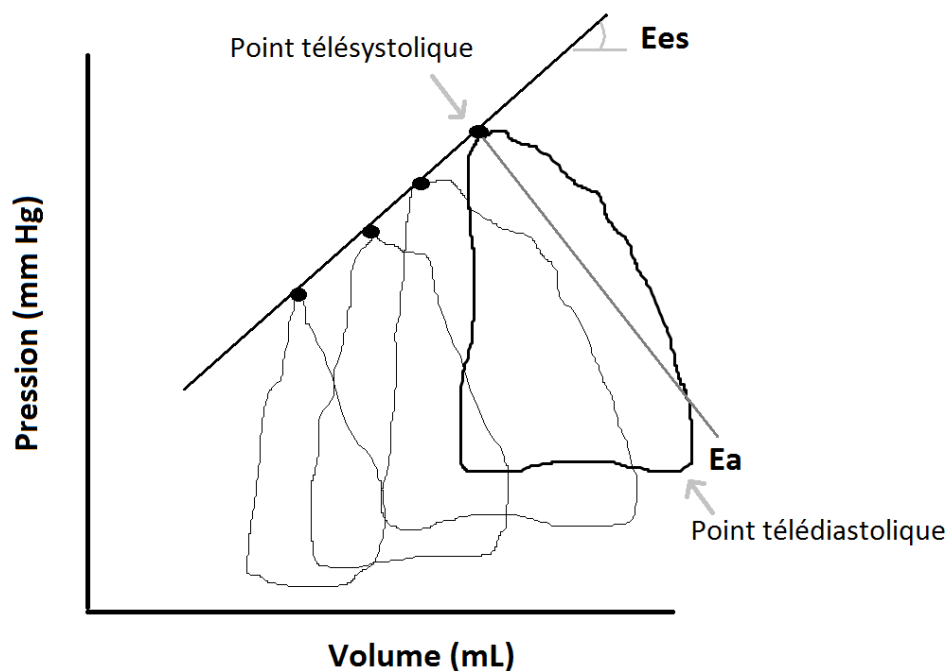
où $P(t)$ et $V(t)$ sont respectivement les pression et volume ventriculaires à l'instant t , et V^0 le volume de mort ou volume d'intersection. E_{es} est indépendante des conditions de charge et est

donc considérée comme l'indice de référence pour quantifier l'inotropisme ventriculaire. Ees renseigne sur la contractilité intrinsèque du myocarde, indépendante des conditions de charge. Elle s'affranchit également de la performance contractile dépendante de la précharge régie par la loi de Frank-Starling. La théorie de Frank-Starling est que la contractilité ventriculaire est en majeure partie déterminée par la précharge. Cette relation linéaire était initialement établie sur cœur sain, or il existe des situations où le travail mécanique augmente alors que la pression veineuse centrale est basse.⁴⁹ Inversement, l'élévation des pressions de remplissage ventriculaires droites peut être la conséquence d'une dysfonction cardiaque, comme dans l'HTP. Ees est déterminée par la pente de la relation entre la pression téléstolique et le volume à différents niveaux de charge, de telle sorte que sa mesure nécessite une l'occlusion transitoire de la veine cave inférieure afin de réduire le volume ventriculaire et faire ainsi déplacer le point de relation pression-volume pour définir la droite. L'équation de cette droite d'élastance ventriculaire est donnée par :

$$\text{PTS} = \text{Ees} (\text{VTS} - \text{V}^{\circ}) = \text{Ees} (\text{VTD} - \text{V}^{\circ} - \text{VES})$$

où PTS est la pression téléstolique, VTS le volume téléstolique, VTD le volume télédiastolique, VES le volume d'éjection systolique. V° est l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses (*Figure 2*).

Figure 2. Représentation schématique des boucles pression-volume du ventricule droit. L'élastance télésystolique (E_{es}) représente la contractilité ventriculaire. Elle est déterminée par la pente de la droite de relation pression-volume télésystolique à différents niveau de précharge. L'occlusion de la veine cave inférieure provoque la diminution de la pression télédiastolique et du volume télédiastolique du ventricule droit et donc le déplacement progressif des boucles pression-volume vers le bas et la gauche à chaque cycle. L'élastance artérielle pulmonaire (E_a) correspond à la pente de la droite perpendiculaire à la droite de relation pression-volume télésystolique. La principale limite de l'analyse des boucles pression-volume du ventricule droit est la difficulté d'obtention d'une mesure fiable du volume ventriculaire en raison de sa géométrie complexe.



Au cours de la phase pré-éjectionnelle, la dérivée première de la pression (dP/dt) est également un bon indice de contractilité. Elle traduit la vitesse d'augmentation de la pression au cours de la phase isovolumétrique. Le pic du dP/dt , ou dP/dt max, est indépendant de la postcharge puisqu'il survient alors que la valve pulmonaire est encore fermée. Cet indice permet ainsi de distinguer si une altération de la fraction d'éjection est simplement la conséquence de

l'élévation de la postcharge ventriculaire ou bien le reflet d'une dysfonction contractile du muscle cardiaque. Le dP/dt max serait cependant influencé par la précharge et nous retiendrons donc E_{es} comme valeur de référence de la contractilité ventriculaire au cours de nos travaux expérimentaux.

2. Aspects énergétiques

La performance de la pompe ventriculaire peut être déterminée par les deux droites d'élastance (E_{es} et E_a). Le point de fonctionnement, appelé couplage ventriculo-artériel, correspond au point d'intersection de ces deux droites et peut être calculé selon la formule :

$$E_{es}/E_a = PTS \times VES / [(VTD - V^o - VES) \times PTS] = VES / (VTD - V^o - VES)$$

Le système pompe – circulation d'aval fonctionne de manière efficace lorsque une partie maximale de l'énergie mécanique générée par la pompe est transmise à sa charge. L'indice de couplage ventriculo-artériel E_{es}/E_a permet de quantifier cette relation énergétique. Le ventricule est efficacement couplé à sa charge lorsque sa valeur tend vers 2. En dessous de 1, l'efficacité du système n'est pas optimale, si bien qu'une majeure partie de l'énergie générée par la pompe n'est pas utilisée pour le travail mécanique externe qui génère la pression, mais en énergie potentielle qui sert à vaincre la postcharge. Le découplage est défini par un ratio $E_{es}/E_a < 1$ et traduit l'inefficacité du transfert d'énergie depuis le myocarde vers la circulation artérielle d'aval. Les valeurs de référence de E_{es} , E_a et E_{es}/E_a parmi les espèces animales sont résumées dans le *Tableau 2*.

3. Applications cliniques

Sur le versant systémique, l'appréciation du couplage ventriculo-artériel permet d'adapter les supports thérapeutiques inotropes ou bien le remplissage dans des conditions pathologiques telles que le choc septique, l'infarctus du myocarde ou l'embolie pulmonaire.⁵⁰⁻⁵² Dans le choc cardiogénique, la mise en place d'un ballon de contre-pulsion intra-aortique permet de restaurer

par exemple un certain degré de couplage ventriculo-artériel systémique en diminuant la postcharge du VG. L'application clinique du concept de couplage ventriculo-artériel se heurte néanmoins aux méthodes de détermination de Ees et Ea. Classiquement l'acquisition du volume et de la pression ventriculaires est nécessaire pour la construction de boucles pression-volume. Expérimentalement, le volume ventriculaire peut être déterminé à partir de la mesure de la conductance de la masse sanguine en réponse à un champ électrique généré entre les électrodes d'un cathéter intra-ventriculaire. Plus récemment des cathéters d'admittance ont été validés expérimentalement mais la détermination du volume ventriculaire par cette méthode repose sur la connaissance préalable du volume d'éjection systolique pour calibrer l'appareil. Ces cathéters de gros diamètre peuvent être introduits par voie percutanée mais nécessitent un placement optimal dans la cavité ventriculaire pour ne pas sous-estimer le volume. En pratique clinique, l'IRM cardiaque permet actuellement de s'astreindre de ces techniques invasives. Grâce au traitement du signal, les volumes ventriculaires peuvent être acquis de manière précise au cours du cycle cardiaque. Concernant l'enregistrement de l'onde de pression, le cathétérisme reste la méthode de référence. Grâce à une acquisition simultanée, les boucles pression-volume peuvent être construites. L'analyse de la relation pression-volume télésystolique par occlusion temporaire de la veine cave inférieure n'est plus appliquée en clinique. La méthode du *single beat elastance* représente une alternative validée aussi bien sur le versant systémique que pulmonaire. Elle ne nécessite pas de modification brutale de la précharge. Elle consiste à ajuster une sinusoïde sur l'onde de pression ventriculaire telle que le point maximum de cette sinusoïde corresponde à la pression maximale qui serait développée par un cycle non éjectant.^{53, 54} L'application clinique du *single beat elastance* dans l'HTP reste à valider sur de larges cohortes de patients.

Tableau 2. Elastance ventriculaire droite (Ees) et élastance artérielle pulmonaire (Ea) et valeur du couplage ventriculo-pulmonaire (Ees/Ea) selon les espèces dans des conditions de charge normales.

Espèce	Poids	Méthodes	Ees	Ea	Ees/Ea
			[mmHg/mL]	[mmHg/mL]	
Rat ³⁰	0.20-0.25	conductance	82±53	150±60	0.53±0.2
Souris ⁶³	0.02-0.04	admittance	1.8±0.5	2.7±1.2	0.71±0.27
Chien ⁴⁹	25	single beat	1.11±0.07	1.0±0.06	1.13±0.08
Chèvre ⁶²	24	single beat	2.0±0.4	1.3±0.1	1.7±0.3
Porcelet ⁴⁸	5.7-6.1	single beat	1.45±0.08	0.91±0.07	1.62±0.09
Porc ⁶⁸	20-25	single beat	1.4±0.2	0.9±0.1	1.4±0.4
Homme ⁵⁵	70	conductance	1.3±0.8	0.7±0.3	1.8±0.6

4. METABOLISME DU VENTRICULE DROIT

a) Substrats énergétiques

La consommation d'adénosine triphosphate (ATP) par le VD est destinée pour 2/3 à la contraction des sarcomères, tandis que le 1/3 restant est consacré au fonctionnement des pompes calciques du réticulum sarcoplasmique et aux canaux ioniques membranaires.⁵⁶ En conditions physiologiques, plus de 60% de l'ATP consommé provient de la phosphorylation oxydative des acides gras et seulement 35% provient de la glycolyse. Le lactate et les corps cétoniques comptent pour 5% de la production énergétique. Cette disproportion s'explique par la plus grande affinité des mitochondries pour les acides gras et par le plus faible rendement énergétique des carbohydrates pour fournir l'ATP.⁵⁷ En fonction des apports nutritionnels, il peut y avoir une redistribution vers la consommation de glucose : c'est le cycle de Randle. La présence en quantité suffisante d'acides gras suffit pour inhiber la glycolyse.⁵⁸ Cette autorégulation tend à disparaître progressivement avec l'âge au profit d'une augmentation de la dépendance au glucose. *In utero*, la consommation d'acides gras par le myocarde est basse, le lactate et le glucose constituent les principales sources d'énergie. En conditions de stress pour le VD, ce phénotype fétal peut être favorisé par la diminution d'expression des gènes impliqués dans le transport et l'oxydation des acides gras.

b) Résistance à l'ischémie

La consommation myocardique en oxygène du VD est de l'ordre de la moitié de celle du VG. De même, le flux sanguin coronaire rapporté à la masse musculaire est inférieur dans le VD. En conditions d'ischémie, la fonction ventriculaire droite est cependant souvent conservée, y compris à la phase aiguë d'un infarctus du myocarde inférieur par occlusion de l'artère coronaire droite. Les nombreuses collatéralités coronaires via l'artère interventriculaire antérieure (réseau septal, artère de la bandelette modératrice) et l'artère infundibulaire préviennent le plus souvent des complications hémodynamiques et rythmiques. Les propriétés physiologiques remarquables de la circulation coronaire droite associées à la forte capacité d'extraction de l'oxygène du myocarde

ventriculaire droit, procurent une véritable résistance à l'ischémie, et surtout un potentiel de récupération fonctionnelle sans comparaison avec les infarctus du cœur gauche.¹³

5. PHYSIOPATHOLOGIE VENTRICULAIRE DROITE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE CHRONIQUE

a) *Remodelage géométrique*

Les principales caractéristiques du remodelage ventriculaire droit comparées au remodelage de la circulation pulmonaire dans l'HTP chronique sont exposées dans le *Tableau 3*. L'adaptation du VD à un stress est complexe et dépend tout d'abord du caractère aigu ou chronique et de la nature de la pathologie. L'âge de survenue ainsi que la sévérité de la maladie causale sont également des facteurs influençant la physiologie ventriculaire droite. D'une manière générale, le VD s'adapte mieux à une surcharge de volume qu'à une surcharge de pression en raison de sa faible masse et de sa grande compliance ; de même il va mieux tolérer une variation chronique de ses conditions de charge qu'un stress aigu. Les surcharges de volume observées dans l'insuffisance tricuspide et les communications inter-atriales sont ainsi longtemps compensées, tandis que l'HTP même modérée, va précocement modifier la géométrie puis la fonction du VD.

Tableau 3. Comparaison du remodelage du ventricule droit et de la circulation pulmonaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire.⁵⁹

	Circulation pulmonaire	Ventricule droit
Différences		
<i>Modifications cellulaires</i>	Résistance à l'apoptose et prolifération aberrante (CE et CML) ; hyperplasie et migration (CML)	Arrêt de croissance et apoptose (CM)
<i>Changements microcirculatoires</i>	Dysrégulation de l'angiogénèse	Diminution de la densité capillaire
Similitudes		
<i>Matrice extracellulaire</i>	↗ de la fibrose interstitielle	
<i>Remodelage mitochondrial</i>	↓ nombre et anomalies de forme et de taille	
	↓ capacité oxydative	
<i>Transformation métabolique</i>	Shift glycolytique	
Controverses		
<i>Inflammation</i>	↗ des cellules mononucléées et des cytokines inflammatoires	↗ des mastocytes et des cytokines inflammatoires
<i>Modulation neurohormonale</i>	↗ de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène ↓ expression des récepteurs β1 adrénergiques	Anomalie de transmission du signal du récepteur de type 1 à l'angiotensine II

CE : cellules endothéliales ; CML : cellules musculaires lisses ; CM : cardiomyocytes

Les variations histologiques seraient plus précoces et plus marquées que dans les situations de

surcharge de volume chroniques avec notamment une augmentation de la densité de tissu conjonctif au détriment de la surface des cardiomyocytes.^{60, 61}

Dans l'hypertension pulmonaire chronique, le VD s'hypertrophie à un stade initial de la maladie afin de maintenir le débit cardiaque. L'hypertrophie ventriculaire droite concentrique va progressivement compenser l'augmentation d'impédance pulmonaire grâce à l'allongement des sarcomères et à l'augmentation de synthèse protéique au sein des cardiomyocytes.⁶² L'augmentation de pression téléstolique ventriculaire droite s'accompagne le plus souvent d'une augmentation du volume téléstolique, résultant en une diminution modérée de la fraction d'éjection du VD. D'après la relation de Laplace, toute élévation de la pression endocavitaire s'associe à une augmentation du stress pariétal compensée par une hypertrophie de la paroi. Cette adaptation est semblable au phénotype fœtal puisque les RVP élevées sont responsables *in utero* d'une hypertrophie physiologique du VD. Cependant cette hypertrophie compensatrice peut aboutir à l'ischémie du VD, puis à l'insuffisance ventriculaire droite. A un stade avancé de l'HTP, lorsque les RVP et le stress pariétal continuent d'augmenter, le VD va se dilater d'après la loi de Laplace. Comparativement aux pathologies du cœur gauche, le VD se dilate plus précocement en réponse à la surcharge de pression. Le stress pariétal chronique favoriserait la surexpression de métalloprotéinases matricielles résultant en un remodelage de la matrice extracellulaire avec un élargissement des espaces entre les cardiomyocytes. Cette dilatation progressive du VD a pour effet direct de réduire la tension s'exerçant sur la paroi libre.⁶³

D'un point de vue fonctionnel, plus les RVP augmentent et plus le découplage entre le VD et la circulation pulmonaire s'aggrave, conduisant à terme à l'insuffisance cardiaque droite. Au stade de décompensation, une désorganisation des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire est souvent observable. La transition structurelle depuis l'hypertrophie concentrique compensatrice jusqu'à la dilatation ventriculaire inadaptée est illustrée dans la *Figure 3*. Les mécanismes moléculaires de cette transition sont méconnus à ce jour.²³ A l'échelle moléculaire, la réorganisation du cytosquelette jouerait un rôle clé dans l'hypertrophie compensatrice. Dans l'insuffisance ventriculaire droite, l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène associée à l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire par étirement prolongé des sarcomères, va en revanche déclencher la voie mitochondriale de l'apoptose.^{64, 65} Rondelet et al ont récemment

observé une augmentation du ratio Bax/Bcl2 sur un modèle chronique de shunt systémico-pulmonaire. Ce génotype pro-apoptotique était associé sur le plan hémodynamique à un découplage ventriculo-artériel et au développement d'une insuffisance cardiaque droite.⁶⁶

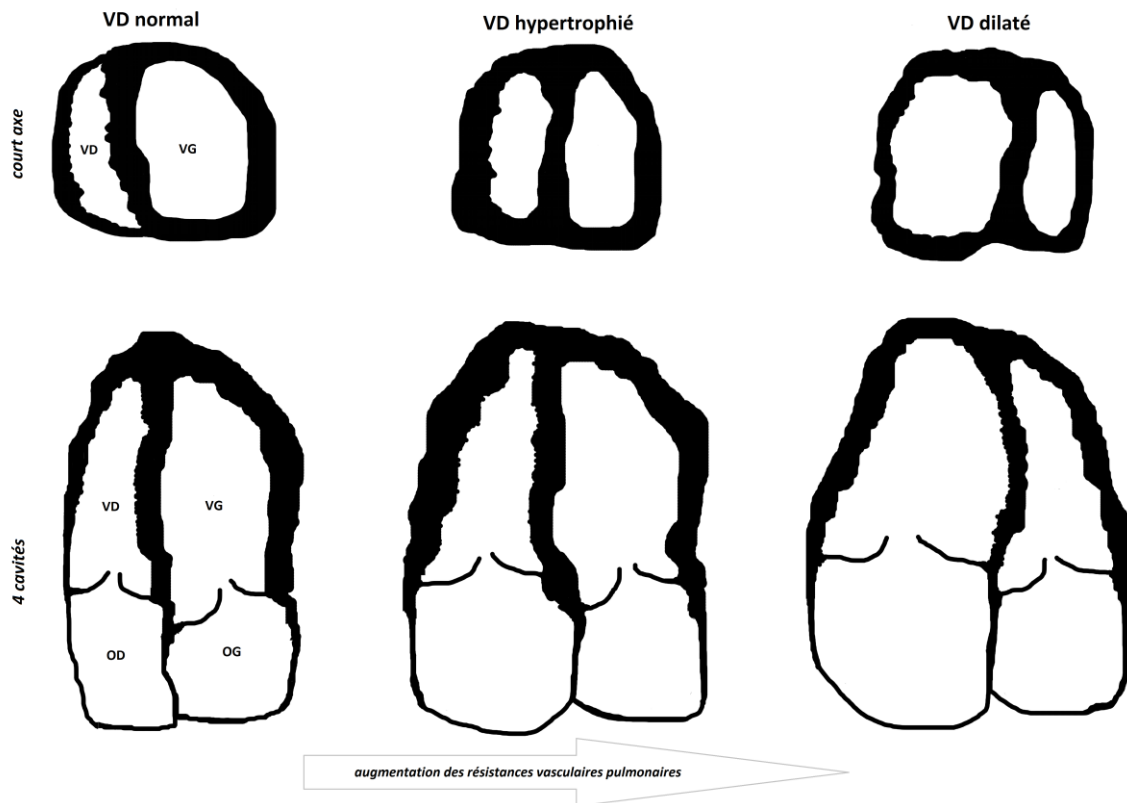
La transition depuis la phase compensée vers l'insuffisance ventriculaire droite n'implique pas seulement les cardiomyocytes, mais également la matrice extracellulaire. En cas de surcharge chronique de pression, le remodelage de la matrice extracellulaire participe à la dysfonction progressive du VD. L'augmentation du taux de fibrose myocardique a ainsi été rapportée dans les modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque droite, mais également chez les patients souffrant d'HTP chronique.^{67, 68} L'augmentation de synthèse du collagène survient précocement dans le contexte de stress myocardique permanent. Cette régulation s'effectue à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Elle atteint son zénith durant la première semaine suivant le début de la surcharge, puis tend à diminuer par la suite. Le taux de collagène dans le myocarde du VD reste cependant plus élevé que dans le VD normal car la dégradation du collagène est elle aussi perturbée.⁶⁹ Sur un modèle d'HTP à la monocrotaline chez le rat, Lamberts et al suggéraient que l'augmentation de densité de collagène dans le myocarde du VD, du septum interventriculaire et du VG pouvait être un important signe de remodelage structural précédant la survenue d'une dysfonction ventriculaire droite. Cette observation démontrait par ailleurs que la dysfonction diastolique du VG dans l'HTP chronique n'est pas seulement liée à la dilatation majeure du VD, mais résulterait également d'un remodelage inadapté de la matrice extracellulaire dont le mécanisme reste à déterminer.⁷⁰ Récemment Rain et al ont rapporté des modifications protéiques associées à la dysfonction diastolique du VD dans l'HTP idiopathique. La perte de phosphorylation de la titine, de même que l'altération de la clairance du calcium intracellulaire, participeraient ainsi à augmenter significativement la rigidité des cardiomyocytes.⁷¹ Le *Tableau 4* résume les principales caractéristiques moléculaires et cellulaires du remodelage inadapté du VD.

Tableau 4. Caractéristiques moléculaires et cellulaires du remodelage ventriculaire droit dans l'hypertension pulmonaire chronique: synthèse de résultats expérimentaux.⁵⁹

Cardiomyocyte	↑ longueur et ↑ diamètre apoptose et nécrose
Matrice extracellulaire	↑ synthèse collagène, ↓ dégradation collagène ↓ densité capillaire ↑ mastocytes, ↑ TNF- α
Contractilité	↓ α-MHC, ↑ β-MHC, ↑ α-SMA ↓ SERCA-2
Relaxation	↓ phosphorylation de la titine et de la cTnI perturbation de la clairance calcique
Métabolisme mitochondrial	shift glycolytique
Stress oxydatif	↓ défenses anti-oxydantes
Modulation neurohormonale	↓ densité récepteurs β-adrénergiques ↑ densité récepteurs de type I de l'angiotensine Défaut de transmission du signal de l'angiotensine

TNF- α : tumor necrosis factor alpha; α -MHC: alpha myosin heavy chain; β -MHC: beta myosin heavy chain;
 α -SMA: alpha smooth muscle actin; AT: angiotensin II; SERCA-2 : sarcoplasmic endoplasmic reticular calcium
ATPase 2.; cTnI: troponine cardiaque I.

Figure 3. Représentation schématisque du remodelage morphologique du ventricule droit (VD) dans l'hypertension pulmonaire (HTP) chronique. L'épaisseur de la paroi libre du VD augmente au stade compensé de l'HTP (hypertrophie concentrique compensée). A un stade plus avancé de la maladie, un remodelage inadapté apparaît sous la forme d'une dilatation du VD pouvant aller jusqu'à restreindre le volume du ventricule gauche (VG).



b) Remodelage métabolique et énergétique

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) joue un rôle important dans les mécanismes d'adaptation du VD. La diminution du débit cardiaque conduit à l'activation neurohormonale en cas d'insuffisance cardiaque. La stimulation adrénergique est le principal mécanisme endogène pour augmenter le travail cardiaque. La sensibilité et la densité des β -récepteurs sont cependant réduites dans l'hypertrophie du VD.⁷² La surcharge chronique de pression dans le VD est reconnue comme déterminant primaire de la densité en β -récepteurs.^{73, 74} Bogaard et al ont récemment rapporté les bénéfices expérimentaux du carvedilol et du metoprolol sur le remodelage ventriculaire droit. Un traitement de 4 semaines par β -bloquants sur 2 modèles

différents d'HTP chronique chez le rat, était associé à une optimisation de la performance systolique du VD.⁷⁵ L'activation locale et systémique du SRAA est impliquée dans le remodelage fonctionnel et structural du VD. Si la modulation neurohormonale est bénéfique à la phase précoce de l'HTP, l'hyperstimulation adrénergique persistante et l'activation du SRAA sont associées à un risque majoré de mortalité chez ces patients.⁷⁶ L'angiotensine II en particulier agit significativement sur le remodelage myocardique. Rouleau et al ont ainsi observé que la surcharge chronique de pression dans le VD entraînait une désadaptation des récepteurs de l'angiotensine II dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire droite compensée chez le lapin.⁷⁷ Cette inadaptation du SRAA conduisait à une altération de la performance contractile, mais pouvait cependant être efficacement inversée après l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, le ramipril.⁷⁷ Le taux élevé d'angiotensine II peut induire l'hypertrophie des cardiomyocytes et la dysfonction contractile. La fibrose secondaire à l'inhibition de la dégradation de collagène et l'inflammation de la matrice extra-cellulaire ont également été rapportées comme conséquences potentielles des taux élevés d'angiotensine II.⁵⁶ Ces effets délétères sont supportés par l'action cardioprotectrice du blocage pharmacologique du SRAA. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ainsi que les bloqueurs des récepteurs de type I pour l'angiotensine diminuent expérimentalement l'expression du collagène de type I et III dans le VD chez les rats.^{78, 79} En cas de surcharge de pression chronique, il y aurait une diminution de la réponse inotrope à l'angiotensine II, ainsi qu'une diminution de densité des récepteurs à l'angiotensine de type 1. Dans l'insuffisance ventriculaire droite, la densité des récepteurs $\beta 1$ adrénergiques diminue en réponse à l'excès de stimulation sympathique.^{80, 81} C'est le même phénomène qui est observé dans la circulation pulmonaire en cas d'HTP.⁷⁶ En revanche, il reste à définir si l'hypertonie sympathique est la cause ou bien la conséquence de l'insuffisance ventriculaire droite. En réponse à l'élévation chronique progressive de la postcharge, la norépinéphrine et l'angiotensine II sont relarguées par le myocarde. Il en résulte une optimisation de la contractilité du VD ainsi qu'une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes.³⁰ Cette activation sympathique est sans doute bénéfique à la phase initiale de la maladie, mais pourrait être délétère à long terme comme le suggère la down-régulation des récepteurs $\beta 1$ altérant la réponse inotrope et lusitrope du VD.⁷⁶

En condition de stress, le VD peut à nouveau présenter un phénotype fétal en réduisant l'expression des gènes impliqués dans le transport et l'oxydation des acides gras, et au contraire en optimisant la glycolyse anaérobie : c'est le shift glycolytique.⁵⁶ La glycolyse nécessite une plus faible consommation d'oxygène que l'oxydation et la phosphorylation des acides gras.⁵⁷ Cette adaptation observée par exemple dans l'insuffisance cardiaque serait délétère à long terme. En outre, il reste à déterminer si le switch glycolytique est une cause ou une conséquence du remodelage ventriculaire inadapté, et si cette orientation vers la glycolyse anaérobie est une adaptation homéostatique ou bien pathologique.⁸² Elle serait bénéfique initialement en réduisant la consommation myocardique en oxygène, mais potentiellement délétère à long terme.⁵⁷ Il reste également à déterminer à quel niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel s'opèrent ces modifications. L'up-régulation du transporteur GluT1 ainsi que la phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase seraient associées à une diminution de consommation d'acides gras par le muscle cardiaque ainsi qu'à une altération de la performance contractile du VD expérimentalement.^{82, 83}

6. INFLAMMATION, HYPERTENSION PULMONAIRE ET REMODELAGE VENTRICULAIRE

De récentes études cliniques et expérimentales mettent en évidence le rôle clé de l'inflammation dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.⁸⁴ L'augmentation du TNF- α pourrait diminuer la performance ventriculaire systolique dans l'insuffisance cardiaque gauche.⁸⁵ Si les neutrophiles sont retrouvés dans la paroi du VD précocement après une augmentation brutale de la postcharge, les macrophages seraient davantage impliqués dans le remodelage chronique du myocarde ventriculaire droit.⁸⁶ Le rôle de l'immunité et de l'inflammation dans la physiopathologie de l'HTP est reconnu. Les patients immunodéprimés (infection par le VIH) ou ceux souffrant d'une pathologie inflammatoire chronique sont à risque de développer une HTP.⁸⁷ L'infiltration du lit artériel pulmonaire par les cellules de l'inflammation (macrophages, lymphocytes T et B, cellules dendritiques) est caractéristique de l'HTP, notamment au niveau des lésions plexiformes.⁸⁸ De même les taux circulants de cytokines (IL1 et IL6) et chémokines pro-inflammatoires (CXCR1, CLXCL1) sont élevés chez ces patients, suggérant qu'il existe un phénomène de recrutement des effecteurs de l'inflammation ciblant les AP.^{88, 89} L'inflammation joue non seulement un rôle majeur dans le développement des lésions vasculaires pulmonaires, mais également dans leur maintenance, puisque la réponse immunitaire innée localement activée va déclencher une réponse immunitaire adaptative inappropriée qui va entretenir les lésions vasculaires pulmonaires via la production notamment d'auto-anticorps.⁹⁰ L'activation de l'immunité adaptative entretiendrait également une certaine mémoire immunologique. Expérimentalement, plusieurs modèles animaux d'HTP reproduisent les caractéristiques histologiques inflammatoires au niveau des artères pulmonaires (modèles à la monocrotaline, modèles angioprolifératifs).⁵⁹ Il semblerait expérimentalement que les thérapies inhibant cette réaction inflammatoire inadaptée bloqueraient le développement de l'HTP et ralentiraient son évolution.⁹¹ De même, 10 à 40% des patients souffrant d'HTP idiopathique auraient des autoanticorps circulants dirigés contre les cellules endothéliales ou bien contre les fibroblastes matriciels.⁹¹ Des études cliniques récentes évoquent une corrélation entre le taux circulant de médiateurs de l'inflammation et la survie des patients. Huertas et al ont publié récemment une revue de la littérature complète sur ce sujet,

soulignant notamment l'impact de la dérégulation de l'immunité sur la fonction endothéliale pulmonaire.⁹⁰ Le rôle précis de la réponse immunitaire inadaptée dans la genèse, l'entretien et l'aggravation de l'HTP reste cependant à étudier. De même il reste définir si le dérèglement de la réponse immunitaire est une cause ou bien la conséquence des lésions endothéliales dans l'HTP. Il semble néanmoins que le développement de nouvelles approches thérapeutiques permettant de moduler la réponse immunitaire innée représente un grand intérêt dans l'HTP chronique associée à des lésions vasculaires pulmonaires sévères.⁹²

MATERIELS ET METHODES

1. MODELES ANIMAUX DE SURCHARGE CHRONIQUE DE PRESSION DANS LE

VENTRICULE DROIT

a) *Règlementation sur l'expérimentation animale*

L'ensemble des expérimentations rapportées dans cette thèse ont respecté les règles d'expérimentation décrite dans les recommandations internationales (« Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals » développées par le *National Institutes of Health*), ainsi que les principes de soins des animaux de laboratoire (*National Society for Medical Research*). Les protocoles de recherche sur l'animal ont été validés par les comités scientifiques respectifs de chacune des deux institutions agréées où se sont déroulés ces travaux expérimentaux (Centre Chirurgical Marie Lannelongue et Universitätsklinikum Eppendorf).

b) *Généralités sur les modèles expérimentaux de remodelage ventriculaire droit*

Différents modèles expérimentaux d'HTP chronique ont été développés et sont listés dans le *Tableau 5*. Chaque modèle apporte des éléments permettant d'approfondir notre compréhension du remodelage et de la dysfonction du VD. D'une manière générale, les gros animaux se prêtent davantage à la modélisation chirurgicale, tandis que les modèles murins offrent la possibilité d'utiliser des animaux génétiquement modifiés pour étudier certaines voies de signal moléculaire spécifiques de l'HTP. Le mécanisme causal de la dysfonction ventriculaire droite varie selon les modèles et peut survenir secondairement à un stress ischémique, hypoxique, toxique ou mécanique (surcharge de pression ou de volume ou les deux associées). Par ailleurs, la surcharge de pression peut être créée par cerclage proximal du tronc de l'AP, ce qui n'affecte pas la circulation pulmonaire à l'inverse des modèles provoquant un remodelage des vaisseaux pulmonaires. Lorsqu'il n'existe pas d'atteinte primitive de la circulation pulmonaire (cerclage de l'AP par exemple), l'adaptation du VD semble davantage durable dans le temps. La dysfonction endothéliale pulmonaire pourrait avoir des effets délétères directs sur le myocarde ventriculaire droit, indépendamment de l'élévation de postcharge. Bogaard et al suggèrent ainsi une médiation paracrine de la défense anti-oxydante du VD par les AP pathologiques.⁹³ La dysfonction du VD

peut se développer par ailleurs de manière aiguë, subaiguë ou chronique selon les modèles. L'induction progressive de la surcharge de pression reflète davantage la physiopathologie de l'HTP humaine. Les animaux en croissance peuvent être en outre particulièrement sensibles aux stress pharmacologiques employés et ainsi développer une HTP de progression plus rapide que les animaux adultes du fait de l'immaturité des vaisseaux pulmonaires.⁹⁴ Un autre paramètre important dans l'analyse des modèles de surcharge de pression du VD est le caractère adapté ou inadapté du remodelage ventriculaire. Le remodelage adapté se caractérise par une hypertrophie concentrique avec un ratio masse/volume élevé et une fonction ventriculaire préservée ou modérément altérée. Les principales caractéristiques du remodelage ventriculaire droit parmi les modèles expérimentaux de surcharge de pression sont résumées dans le *Tableau 6*. La rapidité d'installation de l'HTP de même que sa sévérité et l'âge de l'animal sont autant des paramètres influençant également le remodelage ventriculaire droit.

Tableau 5. Caractéristiques des modèles expérimentaux d'insuffisance ventriculaire droite.⁵⁹

Modèle	Espèce animale	Surcharge VD	Lésions plexif.	Remodelage VD (délai)	Toxicité myocardique	Réversibilité de la surcharge VD
Pharmacologique						
MCT ⁹⁵⁻⁹⁷	rat	Chronique	non	inadapté (3 semaines)	myocardite + lésions coronaires	sous thérapie ciblée de l'HTP
Hypoxie ^{98, 99}	souris, rat	Chronique	non	inadapté (4 semaines)	ischémie	Spontanément
SU5416 ¹⁰⁰	rat nude	Chronique	oui	inadapté (3 semaines)	effets directs du SU5416 sur la circulation coronaire non démontrés	non reporté
SuHx ^{101, 102}	rat	Chronique	oui	inadapté (4 to 14 sem.)	ischémie + effets directs du SU5416 sur la circulation coronaire non démontrés	avec les β -bloquants et le protandim
Interventionnel – Churgical						
Cerclage AP ^{69, 77, 103}	rat, lapin, chat, chien, porc	Aiguë	non	Compensé (3 semaines)	aucun	après retrait du cerclage
SSP ^{66, 104}	porc	chronique	non	Inadapté (6 mois)	aucun	sous thérapie ciblée de l'HTP
IVP ¹⁰⁵	porc, mouton	chronique	non	inadapté (4 mois)	aucun	après correction interventionnelle
HPPE ¹⁰⁶	porc	chronique	non	compensée (5 semaines)	aucun	après correction chirurgicale
Embolie pulmonaire ¹⁰⁷	porc	aiguë	non	inadapté (<1 heure)	aucun	spontanément
Occlusion transitoire de l'AP ¹⁰⁸	agneau	aiguë	non	inadapté (<1 heure)	aucun	spontanément
Transgénique						
BMPR-2 knock out ¹⁰⁹	souris	chronique	non	compensé (8 semaines)	indéterminé	sous enzyme de conversion de l'angiotensine; par inhibition de rho-kinase
Autres						
Fawn-hooded rat ¹¹⁰	rat	chronique	non	compensé (>20 semaines)	indéterminé	après modulation métabolique des CML

VD, ventricule droite; HTP, hypertension pulmonaire; plexif., plexiformes ; BMPR-2, bone morphogenetic peptide receptor type 2; AP: artère pulmonaire; CML: cellule musculaire lisse des artères pulmonaires; IVP: insuffisance

valvulaire pulmonaire ; MCT: monocrotaline; SU5416, semaxinib ; SuHx : semaxinib + hypoxie chronique (3 semaines); SSP: shunt systémico-pulmonaire; HPPE: hypertension pulmonaire post-embolique

Tableau 6. Caractéristiques des remodelages compensé et inadapté du ventricule droit: données expérimentales.^{75, 93, 103, 110, 111 56, 107, 112}

Caractéristiques	Remodelage compensé	Remodelage inadapté
Dimension du VD	normal ou peu dilaté	dilaté
Paroi du VD	hypertrophiée	Fine
Septum interventriculaire	normal	mouvement paradoxal
Contractilité	↗	↓
FEVD au repos	préservée	↓
Réserve VD	↓	↓
Couplage VD/AP	normal ou modérément ↓	Altéré
Fonction diastolique VD	↗ pressions de remplissage	Altérée
Densité capillaire	normale	↓
Fibrose interstitielle	absente	faible à importante
Réponse au stress oxydatif	défense optimale	↓ défense
Substrat énergétique	oxydation des acides gras	glycolyse anaérobie
Métabolisme mitochondrial	normal	Altérée
Génotype fétal	fortement ↗	↗

VD, ventricule droit ; AP, artère pulmonaire ; FEVD, fraction d'éjection du ventricule droit.

c) Modèle porcin d'hypertension pulmonaire post-embolique (HYPPE)

L'hypertension pulmonaire post-embolique (HYPPE) était modélisée en 5 semaines chez des porcelets d'espèce Large White âgés de 2 mois (poids moyen de 20 kg).⁵⁹ Ce modèle a été étudié au sein du *Laboratoire de Recherche Chirurgicale* du Centre Chirurgical Marie Lannelongue

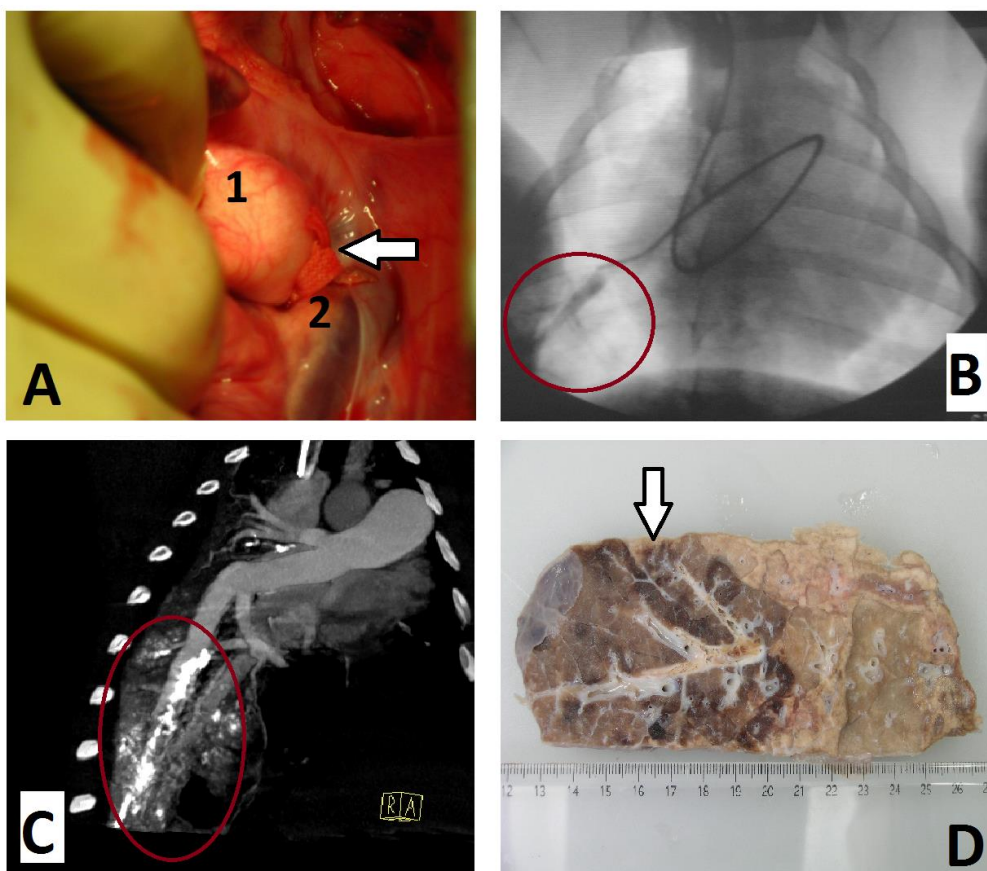
(Université Paris Sud). Les animaux recevaient une prémédication par injection intra-musculaire de kétamine (15 mg/kg). Un monitoring cardiaque et une mesure trans-capillaire continue de la saturation périphérique en oxygène étaient mis en place. L'induction anesthésique était obtenue par inhalation de propofol 1% et maintenue en utilisant une inhalation continue d'isoflurane. Du pancuronium bromide (2 mg IV) était administré pour la relaxation musculaire. L'intubation oro-trachéale (sonde trachéale n°7) était effectuée après pulvérisation sus-glottique de xylocaïne 1%. La ventilation mécanique était réalisée à une fréquence de 10 cycles/min, un volume courant de 15 ml/kg, une pression télé-expiratoire de 5 cm H₂O avec 40% de FiO₂ adaptée à la saturation capillaire de l'animal (Servo 900, Siemens-Elcoma AB, Solna, Suède). Tous les porcs recevaient une antibioprophylaxie peropératoire par cefotaxime (1g) associée à de la gentamycine (80 mg). L'analgésie était assurée par l'administration de nalbuphine (Nubain® 4 mg/20 kg 2 fois par jour) durant 4 jours.

Les animaux étaient installés en décubitus dorsal. Un champage stérile de la région cervico-thoracique antérieure était effectué après badigeonnage à la bétadine dermique. Un film bactériostatique adhésif était ensuite appliqué sur la peau. Le matériel chirurgical était stérilisé après chaque intervention au sein du laboratoire. La modélisation porcine de l'hypertension pulmonaire post-embolique était obtenue au terme de 5 semaines. Le premier temps comportait la ligature de l'AP gauche intra-péricardique à l'aide d'un lac tissé non résorbable (Surgical Loop, 75cm, 4mm, B-Braun, Tuttlingen, Allemagne) par voie de sternotomie médiane avec ouverture du péricarde. Après hémostase rigoureuse, un drain rétrosternal était mis en place et oté au deuxième jour post-opératoire. La fermeture s'effectuait en 3 plans à l'aide de fils tressés à résorption lente (Vicryl®). L'induction progressive d'une HTP nécessitait l'embolisation hebdomadaire des artères segmentaires du lobe inférieur droit (Figure 4B). Une colle tissulaire à polymérisation rapide était employée (Histoacryl®, B-Braun, Tuttlingen, Allemagne). Ce monomère composé de n-butyl-2-cyanoacrylate polymérise en présence de liquide biologique permettant l'occlusion des lumières vasculaires. L'Histoacryl® devait préalablement être mélangé à un corps gras, le lipiodol, dont le pouvoir de saponification prévenait la coagulation accidentelle du cathéter d'embolisation à chaque injection du produit. Le lipiodol est une huile iodée qui permettait, en plus de sa fonction de vecteur, d'opacifier les territoires artériels obstrués à chaque injection. Le contrôle radioscopique

instantané permettait d'observer la topographie des territoires embolisés (*Figure 4 A*). Le cathétérisme sélectif de l'artère lobaire inférieure droite du porc était effectué sous contrôle fluoroscopique après mise en place percutanée d'un introducteur de 7 Fr dans le tronc veineux brachio-céphalique gauche. La valeur de 20 mm Hg constituait le palier de PAP moyenne à atteindre dans notre protocole lors de la première embolisation sélective du lobe inférieur droit. Les doses administrées variaient selon l'animal, entre 0,2 et 0,4 ml par procédure d'un mélange équimolaire d'Histoacryl® et de lipiodol. Chaque injection était réalisée sous surveillance hémodynamique, rythmique et hématosique de l'animal. Des paliers progressifs de PAP étaient respectés pour occlure progressivement les artères segmentaires du lobe inférieur droit (*Figure 4 B,C et D*) et ainsi éviter une élévation trop brutale de la postcharge du VD. Une PAP moyenne à 20 mm Hg à la première semaine, puis à 30 à la deuxième semaine, 40 à la troisième et 50 à la quatrième permettaient d'aboutir à un cœur pulmonaire chronique en 5 semaines. Ce modèle HYPPE reproduisait la physiopathologie complexe de l'hypertension pulmonaire post-embolique en associant sur un même animal des territoires vasculaires obstrués et des territoires non obstrués siège d'une vasculopathie d'hyperdébit.¹¹³

Figure 4. Modèle porcin d'hypertension pulmonaire post-embolique (HYPPE).

A) La ligature de l'artère pulmonaire gauche (flèche) était réalisée par sternotomie médiane avec ouverture du péricarde (1, tronc de l'artère pulmonaire ; 2, artère pulmonaire gauche). **B)** Les branches segmentaires de l'artère lobaire inférieure droite étaient ensuite embolisées chaque semaine par cathétérisme de l'artère pulmonaire droite sous contrôle radioscopique. **C)** L'occlusion progressive du lit artériel dans le lobe inférieur était remarquable sur ce scanner thoracique (coupe sagittale) à 6 semaines chez un porc de 32 kg. **D)** Vue macroscopique d'une section du lobe inférieur droit montrant une large plage ischémique dans le territoire embolisé (flèche).



d) Modèle de reperfusion du poumon gauche

A partir du modèle HYPPE, nous avons modélisé le traitement chirurgical de cette pathologie.¹¹⁴ Une reperfusion chirurgicale du poumon gauche était réalisée à la 6^e semaine de façon à réduire durablement les RVP et ainsi corriger la postcharge du VD comme dans l'endartériectomie pulmonaire chez l'homme. La procédure de reperfusion du poumon gauche se déroulait sous anesthésie générale selon le protocole décrit précédemment. Une thoracotomie postéro-latérale

gauche dans le 4^e espace intercostal permettait l'exposition de l'AP gauche extra-péricardique en aval de la ligature. Une résection-anastomose avec interposition d'un court segment de prothèse vasculaire (Gore®, diamètre 8 mm) permettait de revasculariser l'AP gauche à partir du tronc de l'artère pulmonaire. Une anticoagulation efficace était administrée pour prévenir la thrombose précoce du pontage (héparinate de sodium intra-veineux, 50 UI/kg). Une dose d'entretien journalière était ensuite injectée en sous-cutané jusqu'au sacrifice (enoxaparine, 7000 UI/j). La fermeture musculo-cutanée de la thoracotomie s'effectue en 2 plans à l'aide de fil tressé à résorption lente (Vicryl®). Un contrôle artériographique de la perméabilité du pontage était effectué à 1 et 3 semaines après la reperfusion.

e) Modèle d'hypertension pulmonaire angioproliférative chez le rat

Le modèle d'HTP angioproliférative chez le rat est largement utilisé depuis sa publication par l'équipe de Voelkel en 2001.¹⁰¹ Ce modèle associe un inhibiteur sélectif du récepteur 2 de la tyrosine kinase du vascular endothelial growth factor (VEGF) appelé semaxinib (SU5416, SUGEN Inc., South San Francisco, USA) avec une exposition en milieu hypoxique. Après une injection sous-cutanée unique du semaxinib (20 mg/kg), les rats étaient maintenus en hypoxie dans des chambres hypobariques pendant 3 à 4 semaines.^{75, 101} Les inhibiteurs du VEGF sont habituellement employés en oncologie humaine dans le traitement des tumeurs solides afin de limiter la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Taraseviciene-Stewart et al ont été les premiers à démontrer que l'administration du semaxinib combinée à l'hypoxie chronique provoquait une HTP angioproliférative sévère chez le rat.¹⁰¹ Comparé aux autres modèles d'HTP chez le petit animal (monocrotaline, hypoxie chronique isolée), ce modèle est probablement celui qui est le plus proche de l'HTP humaine du groupe 1 lorsque l'on observe les lésions provoquées dans la circulation pulmonaire (remodelage endothélial et de la média, présence de lésions plexiformes et parfois thrombose *in situ*). Le mécanisme exact par lequel le semaxinib induit des lésions vasculaires pulmonaires irréversibles, ainsi que son tropisme sélectif pour la circulation pulmonaire, ne sont pas complètement déterminés.^{115, 116}

En raison de l'absence de caissons pour générer les conditions d'hypoxie prolongée chez le rat sur le Campus de Recherche de l'Hôpital Universitaire Eppendorf de Hambourg, nous avons choisi

au *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* d'utiliser un modèle alternatif reproduisant également les principales caractéristiques histologiques de l'HTP humaine. Ce modèle repose sur l'administration unique du semaxinib sans hypoxie chronique chez animaux immunodéprimés déficients en lymphocytes T (nude). Taraseviciene et al ont ainsi observé que la circulation pulmonaire des rats nude était beaucoup plus sensible aux effets du semaxinib que les animaux non déficitaires en cellules T, conduisant à une HTP avec remodelage du ventricule droit en 3 semaines.¹⁰⁰ L'association entre HTP sévère et maladies dysimmunitaires (sclérodermie, lupus érythémateux disséminé), ainsi qu'avec les connectivites et les patients infectés par le virus d'immunodéficience humaine, est connue depuis de longues années.¹¹⁷ L'inflammation joue un rôle majeur dans la physiopathologie de ces lésions vasculaires pulmonaires, de même que dans le modèle expérimental au semaxinib. Les rats athymiques (nude) présentaient une grande sensibilité aux stimuli d'HTP (hypoxie chronique, semaxinib, monocrotaline) si bien que l'association de différents stimuli sur le même modèle provoque le décès précoce de l'animal par insuffisance cardiaque droite en quelques jours. Les rats nude développent ainsi une très forte réaction inflammatoire locale dans les AP avec recrutement de macrophages, lymphocytes B et présence d'anticorps anti-cellules endothéliales.¹¹⁶ L'absence d'activité des lymphocytes T régulateurs expliquerait la sévérité des lésions vasculaires pulmonaires observées chez les rats nude, puisque l'administration de cellules CD4⁺ CD25⁻ chez ces animaux permettrait de corriger la plupart des lésions.¹¹⁸

Au sein du *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* (Campus de Recherche, Hôpital Universitaire Eppendorf, Hambourg, Allemagne), nous avons induit une HTP expérimentale chez des rats nude de 6 semaines (poids moyen de 160-200 gr) par injection sous-cutanée de semaxinib initialement à la dose de 20 mg/kg en conditions de normoxie. A 4 semaines, seul un faible nombre d'animaux présentait une HTP sévère avec remodelage du cœur droit. Notre objectif étant d'obtenir un modèle d'insuffisance ventriculaire droite décompensée, nous avons alors choisi d'injecter 40 mg/kg plutôt que 20 mg/kg tel que décrit par les principales équipes utilisant ce modèle. Après suspension dans un diluent préalablement préparé en conditions stériles [0,5% (p/v) carboxyméthylcellulose sodium, 0,9% (w/v) chlorure de sodium, 0,4% (v/v) polysorbate 80, 0,9% (v/v) alcool de benzyle dans l'eau distillée], le semaxinib était rapidement injecté en sous-

cutané à la dose de 40 mg/kg sous sédation légère de l'animal par inhalation d'isoflurane 2%. L'HTP et le remodelage du VD étaient observés à partir de 3 semaines après l'injection. Nous n'avons constaté aucun décès spontané durant les 3 semaines suivant l'injection du semaxinib. A 3 semaines, tous les animaux présentaient en revanche des signes de remodelage du VD avec dilatation significative des cavités cardiaques droites et dysfonction systolique. Parmi les cas les plus sévères, certains rats ont développé un tableau d'anasarque avec épanchements pleuraux, péricardique et péritonéal. Sur un total de 24 rats ayant reçu une injection de semaxinib à la dose de 40 mg/kg, 3 sont décédés prématurément entre la 3^e et la 4^e semaine.

Publication:

**Modèles Expérimentaux d'Insuffisance Cardiaque Droite: une Fenêtre vers la Recherche
Translationnelle en Hypertension Pulmonaire**

**Experimental Models of Right Heart Failure: a Window for Translational Research
in Pulmonary Hypertension**

Julien Guihaire, Harm-Jan Bogaard, Erwan Flécher, Pierre-Emmanuel Noly, Olaf Mercier,

François Haddad, Elie Fadel

Semin Respir Crit Care Med 2013;34:689–699

Communication orale:

Connaissances à partir des Modèles Expérimentaux d'Insuffisance Ventriculaire Droite

Insights from Experimental Models of Right Ventricular Failure

Julien Guihaire, François Haddad, Olaf Mercier, Elie Fadel

Invited Lecture at the 2012 Scientific Sessions of the *American Heart Association*

Los Angeles (USA), 7 Novembre 2012

Experimental Models of Right Heart Failure: A Window for Translational Research in Pulmonary Hypertension

Julien Guihaire, MD, MSc¹ Harm Jan Bogaard, MD, PhD² Erwan Flécher, MD, PhD³
Pierre-Emmanuel Noly, MD, MSc¹ Olaf Mercier, MD, PhD¹ François Haddad, MD⁴ Elie Fadel, MD, PhD¹

¹Laboratory of Surgical Research, Marie Lannelongue Hospital, University of Paris Sud, Le Plessis Robinson, France

²Department of Pulmonary Medicine, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

³Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Pontchaillou Hospital, University of Rennes 1, Rennes, France

⁴Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University, Palo Alto, California

Address for correspondence: Julien Guihaire, MD MSc, Laboratory of Surgical Research, Marie Lannelongue Hospital, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson, France (e-mail: julien.guihaire@u-psud.fr).

Semin Respir Crit Care Med 2013;34:689–699.

Abstract

Keywords

- right ventricle
- experimental models
- pulmonary hypertension
- heart failure
- pathophysiology

The right ventricle (RV) faces major changes in loading conditions associated with cardiovascular and pulmonary vascular disorders. Despite major pharmacological advances since the last decade, pulmonary arterial hypertension remains a deadly disease mainly secondary to the development of right ventricular failure (RVF). Several experimental models of RVF have been developed over the past three decades providing a particular insight in RV pathophysiology. Mechanisms involved in the transition from RV adaptive hypertrophy to maladaptive remodeling and failure in conditions of chronic RV pressure or volume overload are of a great interest but not yet completely understood. Further investigations are needed to find new therapeutic approaches for RVF. Current animal models and emerging concepts of translational RV research will be detailed in this review.

Survival in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) is closely related to right ventricular (RV) function. Although the prognosis of PAH has improved in the last decades, the 5-year mortality of patients with symptomatic disease still ranges from 30 to 50%. Considering the high mortality rate associated with right heart failure, it becomes critical to better understand the mechanisms of RV adaptation to PAH. Recent studies highlight the unique pathways involved in RV remodeling and compensation when compared with left heart failure. Embryologically, the RV arises from the anterior heart field, whereas left ventricle develops from the early heart tube.¹ The normal RV has a more complex geometry and lower myocardial oxygen requirements compared with the LV.² In PAH, the RV has to adapt to a pulmonary vascular resistance that can reach 10 to 20 times normal values. This is in contrast to the left ventricle in

patients with systemic hypertension where the systemic resistance rarely increases by more than two- to threefold.

In this review, we describe the current models used to study RV dysfunction emphasizing their advantages and their limitations. We will also discuss cellular and molecular changes involved in RV maladaptive remodeling. Emerging concepts and future directions in translational RV research will also be presented.

Importance of the Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension and Lung Disease

RV dysfunction is an important predictor of outcome in patients with PAH and heart failure.^{3–8} Among metrics of RV function, the six-minute walking distance (6MWD) is the

Issue Theme Current Challenges in Pulmonary Hypertension; Guest Editor, Marc Humbert, MD, PhD

Copyright © 2013 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel: +1(212) 584-4662.

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1355444>. ISSN 1069-3424.

most simple marker. Studies have shown that 6MWD depends on the stroke volume response during exercise as well as chronotropic response.⁹ 6MWD is a strong and validated predictor of outcome in PAH.¹⁰ In studies addressing hemodynamic predictors of outcome in PAH, elevated right atrial pressure and decreased cardiac index rather than pulmonary pressures have been systematically associated with an increased likelihood of death and transplantation.^{3,11} Hemodynamic studies highlight a common theme that RV adaptation to pulmonary hypertension (PH) rather than pulmonary pressures determines the outcome in PAH. Echocardiographic and magnetic resonance studies highlight the importance of RV enlargement and systolic performance indices such as RV ejection fraction, tricuspid annular plane systolic excursion, or indexed stroke volume.^{4,5,12–19} Pericardial effusion has also emerged in these studies as an independent marker of outcome.^{10,20} Positron emission tomography allows the study of myocardial metabolism in the pressure-overloaded RV, the switch to glucose metabolism correlates with worse ventricular compensation.²¹ Among predictors of outcome in PAF, functional capacity represents one of the strongest.¹⁰ Exercise capacity reflects both cardiopulmonary and peripheral muscle reserve and its most simple metric in PAH is the 6MWD. Finally, circulating biomarkers have also been linked to survival in PAH. Higher levels of B-type natriuretic peptide level, markers of renal and liver dysfunction, and hyponatremia have all been linked to increased mortality.^{19,22,23}

Review of Current Experimental Models in Right Heart Research

Different experimental models of right ventricular failure (RVF) have been developed. Each model adds some insights to the understanding of RV remodeling and dysfunction. In general, large animals are good candidates for surgical models, while murine models have the advantage of selective gene knockout or knockin allowing the investigation of specific molecular pathways involved in RV remodeling. The insult causing RV dysfunction varies between models and can occur secondary to ischemic, hypoxic, toxic, or mechanical (pressure or volume overload) stressor to the RV. In addition, models of pressure overload can be caused by proximal banding of the pulmonary artery that minimally affects the pulmonary vasculature in contrast to models causing pulmonary vasculature remodeling. Furthermore, RV dysfunction can develop acutely, subacutely, or chronically. Considering experimental models of PH, a gradual development of pressure overload is more representative of PH pathophysiology. With regard to PH models, growing animals may be particularly susceptible to faster progression of PH after pharmacological induction. In fact, studies have shown that a greater sensibility to inflammatory damages in perivascular spaces may explain more severe pulmonary vascular injuries in young animals (► Table 1).²⁴

Another important concept in analyzing different models of RV pressure overload is whether the model produces adaptive or maladaptive remodeling of the RV. Adaptive

remodeling is characterized by more concentric remodeling (higher mass-to-volume ratio) and preserved or only minimally impaired function. Characteristics of adaptive and maladaptive remodelings observed in experimental models of RV pressure overload are presented in ► Table 2. The rate of development of PH, the severity of RV pressure overload, and the age of the animal appear to be important determinants in developing adaptive or maladaptive models.

Specific Experimental Models

Pulmonary Artery Banding Model

Pulmonary artery banding (PAB) is usually performed by placing a suture, clip, or inflatable ring around the pulmonary trunk proximally to the RV. The PAB model preserves the pulmonary vasculature so that RV remodeling, and its potential for reversal, is independent from the changes in pulmonary impedance. Use of the PAB model allows for the demonstration of afterload-independent myocardial effects of new therapeutic approaches.^{25–29} Gomez-Arroyo et al recently showed that mitochondrial gene expression and metabolism were preserved despite significant pressure overload after PAB in rodents.³⁰ In the presence of severe PAB, the mortality can reach 40% in adult rodents.²⁹

Monocrotaline Model

Monocrotaline (MCT) is a pyrrolizidine alkaloid present in seeds of the leguminous plant *Crotalaria spectabilis*.³¹ MCT models are achieved by a single subcutaneous injection of MCT resulting in a progressive RV hypertrophy 12 days after. RV dysfunction is usually delayed another 3 to 4 weeks. The MCT model reliably reproduces some of the common pathological features of PAH, in particular small pulmonary artery muscularization. The MCT model is largely used for pharmacological experiments because the currently registered PH therapies can reverse pulmonary vascular injuries induced by MCT. The exact mechanism by which MCT leads to PH is still unclear. MCT is known to induce vascular remodeling within the pulmonary arterial tree in 7 days after administration and pulmonary hemodynamics significantly increase to develop PH during the second week. The response to MCT varies between animal species because of differences in hepatic metabolism. Rats seem to be the best candidates for MCT-induced PH, rather than larger animals.³² The severity of RV dysfunction is strongly related to the initial dose of MCT administered. After 30 mg/kg, adaptive RV remodeling can be observed, whereas RV failure can occur after a single dose of 80 mg/kg.³² However, MCT-related toxicity to the myocardium restricts the relevance of this model to study RV failure. Systemic procoagulant and proinflammatory responses to MCT injection have been demonstrated to cause coronary arteriolar thickening and myocarditis of both ventricles that may be a limitation in studying RV-specific remodeling.³³

Chronic Hypoxia Model

Chronic hypoxia has been commonly used to induce PH in a wide range of animal species. The chronic hypoxia model is highly reproducible despite a varying response to hypoxia

Table 1 Characteristics of current experimental models of right ventricular failure

Model	Animal species	RV overload	Plexiform lesions	RV remodeling (delay)	Myocardial toxicity	Reversibility of RV overload
Pharmacological						
MCT ^{31,32,86}	Rat	Chronic	No	Maladaptive (3 wk)	Myocarditis + coronary arteries injury	After PAH-targeted therapy
Hypoxia ^{34,35}	Mouse, rat	Chronic	No	Adaptive (4 wk)	Ischemia	Spontaneously
SU5416 ⁴³	Nude rat	Chronic	Yes	Maladaptive (3 wk)	Direct effects of SU5416 on coronary microcirculation have not been shown	Not reported
SuHx ^{39,40}	Rat	Chronic	Yes	Maladaptive (4–14 wk)	Ischemia + direct effects of SU5416 on coronary microcirculation have not been shown	With beta-blocker and Protandim therapy
Interventional—Surgical						
PA banding ^{26–28}	Rat, rabbit, cat, dog, pig	Acute	No	Adaptive (3 wk)	None	After banding removal
SPS ^{50,74}	Pig	Chronic	No	Maladaptive (6 mo)	None	After PAH-targeted therapy
PVI ⁸⁷	Pig, sheep	Chronic	No	Maladaptive (4 mo)	None	After interventional correction
CTEPH ⁶¹	Piglet	Chronic	No	Maladaptive (5 wk)	None	After surgical correction
PA embolism ⁸⁸	Piglet	Acute	No	Maladaptive (< 1 h)	None	Spontaneously
Transient PA occlusion ⁶⁷	Lamb	Acute	No	Maladaptive (< 1 h)	None	Spontaneously
Transgenic						
BMPR-2 knockout ⁶⁴	Mouse	Chronic	No	Adaptive (8 wk)	Undetermined	With exogenous angiotensin-converting enzyme 2; with rho-kinase inhibition
Others						
Fawn-hooded rats ²⁵	Rat	Chronic	No	Adaptive (> 20 wk)	Undetermined	After metabolic modulation of PAMCs

Abbreviations: RV, right ventricle; BMPR-2, bone morphogenetic peptide receptor type 2; PA, pulmonary artery; PAMCs, pulmonary artery smooth muscle cells; PAH, pulmonary arterial hypertension; PVI, pulmonary valve insufficiency; MCT, monocrotaline; SuHx, SU5416 + chronic exposure to hypoxia (3 weeks); SPS, systemic-to-pulmonary shunt; CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

among animal species.²⁴ Mice seem to develop less severe PH, whereas newborn calves present major pulmonary arteries damage resulting in a dramatic increase in pulmonary vascular resistance, often higher than systemic vascular resistance.^{34,35} Significant stiffening of large proximal pulmonary arteries is observed in response to chronic hypoxia, especially in rodents and calves, leading to increased

pulmonary arterial elastance and decreased compliance. There is, however, little evidence for associated RVF in chronic hypoxia models and adapted hypertrophy is most of the time only observed after 2 to 3 weeks.^{36,37} The recovery of vascular injury after return to normoxic conditions is a major limitation to the use of the chronic hypoxia model to study chronic RV dysfunction.

Table 2 Characteristics of adaptive and maladaptive remodelings of the right ventricle: insights from experimental findings^{25,27,29,38,61,69,88,89}

Characteristics	Adaptive remodeling	Maladaptive remodeling
RV size	Normal size or mild dilatation	Enlargement
RV wall	Hypertrophied	Thinned in respect to chamber dilatation
Interventricular septum	Normal motion	Paradoxical motion
Contractility	Increased	Increased
RVEF at rest	Preserved	Decreased
RV reserve	Decreased	Decreased
VA coupling	Normal or mildly decreased	Impaired
RV diastolic function	Elevated filling pressure	Impaired
Capillary density	Normal	Decreased
Interstitial fibrosis	Absent	Mild to moderate
Response to oxidative stress	Optimal defense	Failing defense
Energetic substrate	Fatty acid oxidation	Aerobic glycolysis
Mitochondrial metabolism	Normal	Impaired
Fetal genotype	Markedly upregulated	Upregulated

Abbreviations: RV, right ventricle; RVEF, right ventricular ejection fraction; VA, ventricular arterial.

Angioproliferative Pulmonary Hypertension Model

This model associates a selective tyrosine kinase inhibitor of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 SU5416 (Semaxinib, SUGEN Inc., South San Francisco, CA) with chronic hypoxia in rodents. After a single subcutaneous injection of SU5416 (20 mg/kg), rodents are exposed to hypoxia for 3 to 4 weeks in a hypobaric chamber.³⁸ VEGF-receptor blockers are currently applied in human cancer therapy to limit proliferation and survival of endothelial cells. Taraseviciene-Stewart et al were the first to show that SU5416 combined with chronic hypoxia could result in severe angioproliferative PH in rats.³⁹ Compared with other animal models of PH (MCT or hypoxia), the SU5416 model is probably closer to human PAH. Nonreversible neointimal occlusive lesions in peripheral pulmonary artery, resembling plexiform lesions, can actually only be reproduced in this model.⁴⁰ Increased proliferative capacity of endothelial cells has been linked to severe PH in this model. This paradoxical observation may be explained by an abnormal response of apoptosis-resistant endothelial cells to growth factors.⁴¹ The exact mechanism by which SU5416 can selectively target the pulmonary circulation is still unclear. High systemic exposure to SU5416 for a short period is sufficient to induce nonreversible and severe damage within the pulmonary vasculature. The SU5416 compound has a rapid clearance and does not accumulate in solid organs or tissues.⁴² The time of onset of RVF after SU5416 administration ranges from 4 to 14 weeks among studies.^{29,40} The Voelkel's group reported in 2007 another SU5416-model without chronic hypoxia exposure in immunodeficient rats lacking T cells.⁴³ RV adaptive hypertrophy was reported 3 weeks after SU5416 injection in this paper. Furthermore, the SU5416 compound is known to inhibit not only VEGF-receptor 2 tyrosine kinase but also

other tyrosine kinases, such as KIT, MET, FLT3, and RET which could be involved in heart diseases. For complementary details on SU5416-induced PH in rodents, please refer to the complete review by Nicolls et al.⁴⁴

Systemic-to-Pulmonary Shunt Models

A growing proportion of patients with congenital heart disease nowadays survives into adulthood and may develop PH and RVF.⁴⁵ PH associated with systemic-to-pulmonary shunts (SPS) is classified in group 1 of the WHO classification of PH.⁴⁶ Shunts can be in the pre- or posttricuspid location, or be extra-cardiac like in patent ductus arteriosus. Interestingly, the prognosis of patients with PH associated with congenital heart disease is better than the prognosis of patients with other forms of PAH.⁴⁷ Mechanisms of RV delayed dysfunction as well as effects of new therapeutics on pulmonary circulation are not clearly understood, supporting the need for further experimental approach in this setting.

Many experimental models of PH associated with congenital heart disease have been reported. The most commonly used model is the piglet model of a patent ductus arteriosus.^{48–50} Following the modified Blalock-Taussig technique, either a transposition of the carotid or subclavian artery in pulmonary trunk, or a bypass between the thoracic aorta and the pulmonary artery, can be performed (→ Fig. 1).^{51,52} Additional ligation of the left pulmonary artery can be used to rapidly increase pulmonary impedance.⁵³ Patent ductus arteriosus-like shunts induce significant pulmonary vascular remodeling related to elevated shear stress and are associated with a progressive increase in pulmonary vascular resistance. Significant changes in pulmonary hemodynamics occur after 2 to 3 months, depending on the shunt diameter and also on the animal's age

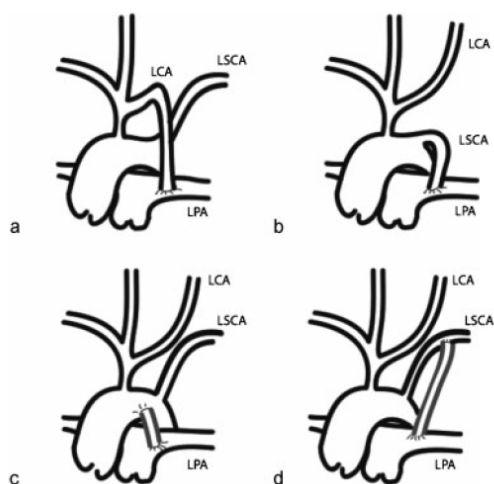


Fig. 1 Systemic-to-pulmonary shunts in porcine model. (a) Blalock-Taussig shunts between left carotid artery (LCA) or (b) left subclavian artery (LSCA) and left pulmonary artery (LPA). (c) Modified Blalock-Taussig shunts can be performed using a conduit between thoracic aorta or (d) LSCA and LPA. Note particular anatomy of the porcine aortic arch with LCA rising from brachiocephalic trunk.

and species. Younger animals may experience a more rapid disease progression.²⁴ Morphological remodeling of the RV is characterized by a concentric hypertrophy with an increased Fulton ratio as defined by $RV/(left\ ventricle + septum)$ weight ratio. RV dysfunction usually develops after 3 to 6 months, whereas RVF occurs after at least 6 months of SPS.^{50,53} Monitoring SPS patency is furthermore challenging in living cases. The Fick principle is used to calculate systemic and pulmonary outputs and the ratio of pulmonary-to-systemic flow is usually around 1.7.

Pulmonary Regurgitation Models

Surgical models have reproduced the physiology observed clinically in tetralogy of Fallot. Such a physiology is usually reproduced in large animals by plication of the pulmonary valve leaflets combined with pulmonary trunk banding.⁵⁴ Secondary tricuspid regurgitation occurs so that RV volume overload is progressive. Impairment of RV systolic function and LV compliance are observed after 3 months. Experimental isolated pulmonary valve insufficiency has also been reported in small and large animals. In large animals, this can be accomplished by removal of the pulmonary leaflets with or without patch enlargement of the pulmonary trunk. An endovascular approach with transcatheter impairment of valve function has also been used.⁵⁵ These models are often used to study the safety and feasibility of implantation of intravascular devices to replace the failing pulmonary valve in the setting of RV outflow tract enlargement.⁵⁶

Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Model
The development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) may be related to prior episodes of

acute pulmonary embolism or in situ thrombosis leading to progressive obstruction of the pulmonary arterial tree.⁵⁷ CTEPH remains underdiagnosed, although it is still the only cause of PH which can be reversed.⁵⁸ The complexity and heterogeneity of pulmonary vascular damages warrant the development of experimental models of CTEPH. Further clarification of the pathophysiology of RV dysfunction in the setting of CTEPH may improve the estimation of the surgical risks before pulmonary endarterectomy.⁵⁹ A better understanding of RV ability to recover after PH correction might also lead to new therapeutic targets that could benefit all PH patients.

Our group developed a large animal model of CTEPH.⁶⁰ A ligation of left pulmonary artery inside the pericardium is first performed on 2-month-old piglets. Embolization of segmental arteries of the right lower lobe is then realized 1 week later and weekly repeated during 5 weeks (► Fig. 2). A soft tissue glue containing *N*-butyl-2-cyanoacrylate is used to progressively increase pulmonary vascular resistance, thanks to complete and irreversible obstruction of segmental pulmonary arteries of the right lower lobe. Selective catheterization of areas to be occluded is realized under fluoroscopic guidance. After 5 weeks, experimental PH results in RV remodeling and ventricular-arterial coupling impairment.⁶¹ This large animal model enables repeated noninvasive (echocardiography) and invasive measurements (right heart catheterization) to follow pulmonary hemodynamics and RV changes by the same approach as used in clinical practice (► Fig. 2). Significant enlargement associated with myocardial hypertrophy can be observed at 6 weeks. Heart failure does not usually occur at that stage probably because the pericardium is left opened after pulmonary ligation. Adverse effect of RV enlargement on cardiac output has been demonstrated to be significantly lower when the pericardium is open.⁶² The piglet CTEPH model is thus a compensated model rather than a maladaptive model. This model may also be helpful to investigate mechanics of RV recovery after surgical treatment of PH. To reproduce the postoperative hemodynamic benefits of pulmonary endarterectomy, a left lung reperfusion can be performed through left thoracotomy. By reducing pulmonary vascular resistance, this surgical procedure induces unloading conditions that are necessary for RV functional improvement after chronic pressure overload.⁶³

Transgenic Bone Morphogenetic Peptide Receptor Type 2 Knockout Model

West et al first reported in 2004 a transgenic mouse model of bone morphogenetic peptide receptor type 2 (BMPR-2) depletion in smooth muscle cells, reproducing pulmonary vascular damages resembling histological features of PAH. Related RV remodeling was characterized by compensated hypertrophy in 8-week-old mice.⁶⁴ Impaired bone morphogenetic peptide signaling is found in more than 70% of patients with hereditary PAH, while less of 20% of sporadic cases are heterozygous for BMPR-2-negative mutation.⁶⁵ Loss of BMPR-2 is associated with aberrant proliferative responses to growth factors, including transforming growth factor- β . Although BMPR-2 expression is required for outflow tract and septal formation during

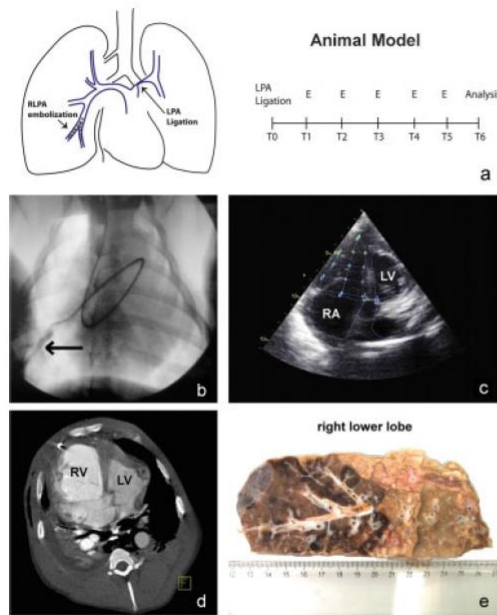


Fig. 2 Experimental model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in piglets. Experimental protocol is illustrated in a. Embolizations (E) of right lower lobe pulmonary arteries (RLPA) are performed after selective catheterization under fluoroscopic guidance. (b) Tissue glue (N-butyl-2-cyanoacrylate) can be observed after injection in the selective area (black arrow). Structural remodeling of the right ventricle (RV) related to chronic pressure overload can be observed at 6 weeks using two-dimensional echocardiography (c) or computed tomography scan imaging (d). Enlargement of the RV compared with left ventricular (LV) area at the end-diastolic time is remarkable (c and d). Right lower lobe examination after lung procurement shows persistent segmental and subsegmental occlusion of pulmonary arteries 6 weeks after the last embolization procedure (left dark area, e). RA: right atrium; LPA: left pulmonary artery; T0, baseline; T1 to T6, week 1 to week 6.

cardiogenesis, impact of BMPR-2 mutations on RV mechanical properties remains not well understood.⁶⁶

Other Models

Several other PH models have been reported to induce RV dysfunction, most of them in rodents. Transient balloon occlusion of main PA is rather an acute RV failure model than a progressive RV remodeling model.⁶⁷ Fawn-hooded rats display congenital defective serotonin metabolism resulting in spontaneous and nonreversible pulmonary vascular injuries with some characteristics similar to human PAH. However, PH is only observed after 20 weeks, and RV failure is therefore delayed.²⁵ Overexpression of interleukin-6, angiotensin-1, or 5-hydroxytryptamine transporter have also been genetically induced in murine models to cause chronic PH. RV adaptability of these transgenic models has been poorly investigated.⁶⁸ More recently, groups are focusing on developing models of PAH based on induced pluripotent stem cells for drug screening purposes.

Overview of Pathways Involved in Right Ventricular Remodeling and Failure

Although emphasis in PAH was initially mainly placed on pulmonary arterial remodeling, more emphasis is currently being placed on RVF. The pulmonary circulation and RV function are intimately coupled both in disease and healthy conditions and understanding the pathobiology of both processes is therefore important. Characteristics of RV remodeling in PAH compared with changes observed in the pulmonary vasculature are summarized in ►Table 3.

Most of molecular pathways currently expected to be involved in RV adaptation to PH have been shown operational in left heart failure.⁶⁹ Molecular insights from experimental models of right heart failure are shown in ►Table 4. Mechanical stress might determine changes in RV gene expression as attested by significant upregulation of natriuretic peptides in the hypertrophied RV.²⁷ Reversion or similarities to a fetal genotype has been reported to occur, especially changes in contractile protein expression. Downregulation of fast α -myosin heavy chain (α -MHC) is compensated by synchronous overexpression of slow β isoform.⁷⁰ Whether these changes are beneficial or detrimental for the stressed RV is still unclear. As α -MHC requires higher amounts of adenosine-triphosphate to generate force, a decreased α/β myosin ratio may provide an energy-sparing profile for the compensated RV. However, it is undetermined whether chronic upregulation of the β -isoform is sufficient to compensate for the persistent elevated afterload. Long-term consequences of α -cardiac actin downregulation on contractile performance are also unknown.⁶⁹ Microarray technologies might find other specific genes involved in the transition from adaptive hypertrophy to maladaptive remodeling and failure.^{71,72}

A recent review by Voelkel et al summarizes the pathways involved in RV remodeling.⁷³ RV remodeling is multifactorial and the contribution of each process will vary depending on the type of overload or injury. In pressure overload states, the pathobiology of RV failure appears to be dependent on the interplay of myocardial induced stress, neurohormonal activation, and myocardial ischemia.

Increased levels of reactive oxygen species may result from a failing antioxidant defense in the stressed RV.²⁹ Oxidative stress is a strong activator of the mitochondrial apoptotic pathway.⁶⁸ Rondelet et al recently observed an enhanced Bax/Bcl2 ratio in a 6-month SPS model. This proapoptotic profile was found to contribute to RV-PA uncoupling and RV failure.⁷⁴ Cardiomyocyte hibernation and growth arrest contrast with the resistance to apoptosis which is seen in the pulmonary vasculature in PAH.⁷⁵ Myocardial hypertrophy efficiently compensates for the elevated afterload in the early stages of PH. The insufficient adaptation of the capillary network commonly observed in this stage may result from an increase in cardiomyocytes cross-sectional area or impaired VEGF signaling.⁷⁶

Neurohormonal activation is a major homeostatic adaptation to maintain ventricular performance in the setting of heart failure. However, chronic sympathetic overstimulation and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) upregulation

Table 3 Comparative remodeling of right ventricle and pulmonary circulation in PAH: main cellular and interstitial features^{68,69,73,85}

	Pulmonary circulation	Right ventricle
Differences		
Cellular changes	Resistance to apoptosis and aberrant proliferation (PAECs and PASMCs); hyperplasia and migration (PASMCs)	Growth arrest; apoptosis (CMs)
Microcirculation changes	Dysregulated angiogenesis	↓ Capillary density
Similarities		
Extracellular matrix	↑ Interstitial fibrosis	↑ Interstitial fibrosis
Mitochondrial remodeling	↓ Number and abnormal shape and size ↓ Oxidative capacity	↓ Number and abnormal shape and size ↓ Oxidative capacity
Metabolic transformation	Glycolytic shift	Glycolytic shift
Controversies		
Inflammation	↑ Mononuclear cells and inflammatory cytokines	↑ Mast cells and inflammatory cytokines
Neurohormonal modulation	↑ACE activity (PAECs); downregulation of β1-adrenergic receptor (PASMCs)	Impairment of AT-R1 signaling pathway

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; ATII, angiotensin II; AT-R1, angiotensin II receptor type 1; CMs, cardiomyocytes; PAECs, pulmonary artery endothelial cells; PAH, pulmonary arterial hypertension; PASMCs, pulmonary artery smooth muscle cells.

may be detrimental for the RV. Rouleau et al observed angiotensin-II receptors uncoupling in a compensated RV hypertrophy rabbit model.²⁶ Fibrosis secondary to inhibition of collagen degradation and extracellular matrix inflammation have also

Table 4 Right ventricular genotype changes in response to chronic pressure overload^{27,28,70–72}

Myocardial genes	Changes in expression
Natriuretic peptides	
Atrial natriuretic peptide	↑
Brain natriuretic peptide	↑
Calcium handling	
Sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase	↓
Phospholamban	↓
Contractile proteins	
α-Myosin heavy chain	↓
β-Myosin heavy chain	↑
α-Cardiac actin	↓
α-Smooth muscle actin	↑
α-Skeletal actin	↑
Extracellular matrix	
α1-procollagen	↑
Small leucine-rich proteoglycans	↑
Apoptotic profile	
Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1	↑
p53	↑

been related to increased level of angiotensin-II.⁶⁹ Under persistent overload conditions, extracellular matrix changes may lead to RV dysfunction. Increased rate of myocardial fibrosis has been reported in RV failure models as previously demonstrated in PH patients.⁷ Recent animal and human studies support that inflammation may play a key role in heart failure development.⁷⁷ Studies by Watts et al have shown that neutrophils are found in the RV myocardium early after an acute increase in afterload; macrophages may rather be involved during progressive remodeling in the setting of chronic PH.^{68,78} Mast cells infiltration and increased expression of tumor necrosis factor-α may be observed in the hypertrophied RV; however, these findings have not been clearly related to RVF yet.⁷⁹

A switch from fatty acid oxidation to glycolysis is presumably a protective response of the stressed left heart, as carbohydrate metabolism requires less oxygen amount than fatty acid oxidation.⁶⁸ Consequences of long-term preferential use of glucose as the main energetic substrate remain, however, to be investigated in experimental model of RVF. Decreased mitochondrial activity resulting in a switch from aerobic to anaerobic metabolism might also be involved in the transition from compensated RV hypertrophy to maladaptive remodeling.⁶⁸

Right Ventricular Response to PAH Therapy in Experimental Models of Pressure Overload

In patients with PAH, the RV function may improve as a result of a decrease in pulmonary vascular resistance or compliance or as a result of improved contractility or inotropy. Although, prostanoid, phosphodiesterase inhibitors, and endothelin receptor blockers have been shown to improve functional capacity of patients with PAH, only a few studies have directly

Table 5 Right ventricular response to pharmacotherapy: insights from experimental models of PAH

Drug	Pressure-independent effects	Pressure-dependent effect
PAH-targeted therapy		
Phosphodiesterase-5 inhibitors (sildenafil) ^{80,90–92}	↑ T-tubule organization ↑ Mitochondrial activity ↓ Ventricular dilatation ↑ Contractility	↓ Myocardial fibrosis ↑ Capillary density ↑ Ventricular–arterial coupling
Prostacyclin analogs ^{93,94}	↑ capillary density	↓ Myocardial fibrosis ↑ Ventricular–arterial coupling
Endothelin-1 receptor antagonists ^{81,95}	↓ Contractility	↓ Myocardial fibrosis
Emerging concepts		
Levosimendan ⁸⁸	↑ Contractility	↑ Ventricular–arterial coupling (marked decreased in pulmonary arterial elastance)
Carvedilol ³⁸	↓ Myocardial fibrosis ↑ Capillary density ↑ Systolic function ↓ Ventricular dilatation	Any effect on pulmonary circulation
Enalapril ⁹⁶	↓ Myocardial fibrosis	↓ Myocardial hypertrophy
Pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor (dichloroacetate) ^{25,97}	↑ Mitochondrial oxidative activity	↑ Survival ↑ Cardiac performance ↑ Exercise capacity
Antioxidant (EUK-134) ⁹⁸	↓ Oxidative stress ↓ Proapoptotic signaling ↓ Myocardial fibrosis ↑ Systolic function	Any effect on pulmonary circulation
Multikinase inhibitors (sunitinib and sorafenib) ⁹⁹	↓ Cellular hypertrophy ↓ Myocardial fibrosis ↑ Systolic function	↓ Cellular hypertrophy ↓ Myocardial fibrosis ↑ Systolic function
Rho-kinase inhibitor (fasudil) ¹⁰⁰	Unknown	↓ Ventricular dilatation ↑ Systolic function

Abbreviation: PAH, pulmonary arterial hypertension.

studied the effects on RV contractility of compliance. ▶ **Table 5** summarizes some of the key effects of these medications on RV function. Experimentally, data from Nagendran et al demonstrate that sildenafil improves myocardial contractility, while bosentan may have negative inotropic effects on the RV.^{80,81} Since no trial has directly compared these medications, the clinical consequences of these differences require further study. In a mechanistic study, Kerbaul et al have shown that prostacyclin mainly improves ventricular–arterial coupling through vasodilator effects and not by directly improving contractility.⁸² Understanding the effects on both the pulmonary vasculature and the right heart are important in the pharmacological approach of PH. Medications that could be beneficial on the pulmonary vasculature but detrimental on the heart may lead to clinical worsening (▶ **Table 5**).

Future Directions in Translational Right Ventricular Research

A pathobiological concept has emerged in which adverse pulmonary vascular remodeling is based on a quasimalignant

nature of endothelial and smooth muscle cells.⁷³ In the development of new treatments for pulmonary vascular diseases, a critical paradox has to be faced: while the remodeled lung vasculature is characterized by angiogenesis, apoptosis resistance, and cell proliferation, the failing RV may suffer from ischemia, capillary rarefaction, and cardiomyocyte apoptosis. Thus, new treatments designed to tackle any quasimalignant feature in the sick-lung circulation could have detrimental effects in an ischemic, fibrotic, and dysfunctional RV. One example of a treatment strategy with beneficial effects in the lung but adverse effects in the heart is the use of broad-spectrum inhibitors of histone deacetylases.^{83,84} It is conceivable to develop treatments with beneficial effects in the heart and at the same time positive or neutral effects in the lungs. Mitigating the inflammatory response, preventing reactive oxygen species/reactive nitrogen species disequilibrium, and reversing ECM remodeling are likely to be beneficial in both the heart and the pulmonary circulation. Aldosterone receptor blockers and other inhibitors of the RAAS could fulfill the task, as well as epidermal growth factor receptor blockers and tetrahydrobiopterin that reverse endothelial nitric oxide synthase uncoupling.^{69,85} It may also be possible to specifically

target the heart, without affecting the pulmonary vasculature. Specific support of RV contractility can perhaps be accomplished directly with carvedilol or levosimendan.³⁸ The combined actions of growth hormone and PDE5 inhibitors as pulmonary vasodilators and inhibitors of cardiomyocyte apoptosis may provide a new treatment direction. It is important to remember that PH is a cardiopulmonary disease. In the ideal model of drug development, the preclinical test phase does not end when a certain drug is identified which reverses the vascular pathology in, for example, the SU5416/hypoxia model. Additional preclinical testing is then required in the PAB model, to ascertain specific effects on the overloaded RV. Before careful clinical studies are conducted, the possibility needs to be excluded that a drug with benefit in the lungs of some PH patients causes a disaster in the heart of others.

Conclusion

RV adaptation to pressure overload is a key determinant of survival in PH. Studies on the mechanisms involved in the transition from compensated hypertrophy to maladaptive state have focused on extracellular matrix remodeling and changes in cardiomyocytes metabolism. Improvement in fatty acid uptake combined to modifying glucose oxidation might be promising for pharmacologic intervention even if it remains unclear whether these metabolism disorders induce or are the result of RV dysfunction. Further experimental investigations are necessary to assess RV response to current PAH medications and to elaborate new modulations therapies which may perhaps improve RV performance in the setting of persistent pressure overload.

References

- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005;6(11):826–835
- Zong P, Tune JD, Downey HF. Mechanisms of oxygen demand/supply balance in the right ventricle. *Exp Biol Med* (Maywood) 2005;230(8):507–519
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991;115(5):343–349
- Ghio S, Gavazzi A, Campana C, et al. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(1):183–188
- Ghio S, Klersy C, Magrini G, et al. Prognostic relevance of the echocardiographic assessment of right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol* 2010;140(3):272–278
- Guazzi M, Arena R. Pulmonary hypertension with left-sided heart disease. *Nat Rev Cardiol* 2010;7(11):648–659
- Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* 2008;117(13):1717–1731
- Haddad F, Kudelko K, Mercier O, Vrtovec B, Zamanian RT, de Jesus Perez V. Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis* 2011;54(2):154–167
- Provencher S, Hervé P, Sitbon O, Humbert M, Simonneau G, Chemla D. Changes in exercise haemodynamics during treatment in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2008;32(2):393–398
- Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation* 2010;122(2):164–172
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexia-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010;122(2):156–163
- Ghio S, Pazzano AS, Klersy C, et al. Clinical and prognostic relevance of echocardiographic evaluation of right ventricular geometry in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol* 2011;107(4):628–632
- Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(9):1034–1041
- van Wolferen SA, Marcus JT, Boonstra A, et al. Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2007;28(10):1250–1257
- van Wolferen SA, Marcus JT, Westerhof N, et al. Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2008;29(1):120–127
- van Wolferen SA, van de Veerdonk MC, Mauritz GJ, et al. Clinically significant change in stroke volume in pulmonary hypertension. *Chest* 2011;139(5):1003–1009
- Vonk Noordegraaf A. The image of pulmonary hypertension. *J Bras Pneumol* 2011;37(3):283–284
- Vonk Noordegraaf A, Galie N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev* 2011;20(122):243–253
- Vonk Noordegraaf A, Westerhof N. Right ventricular ejection fraction and NT-proBNP are both indicators of wall stress in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007;29(4):622–623
- Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, et al. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(7):1214–1219
- Oikawa M, Kagaya Y, Otani H, et al. Increased [18F]fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(11):1849–1855
- Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2000;102(8):865–870
- Reesink HJ, Tulevski II, Marcus JT, et al. Brain natriuretic peptide as noninvasive marker of the severity of right ventricular dysfunction in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg* 2007;84(2):537–543
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(6):L1013–L1032
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006;113(22):2630–2641
- Rouleau JL, Kapuku G, Pelletier S, et al. Cardioprotective effects of ramipril and losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit: importance of kinins and influence on angiotensin II type 1 receptor signaling pathway. *Circulation* 2001;104(8):939–944
- Thompson JT, Rackley MS, O'Brien TX. Upregulation of the cardiac homeobox gene Nkx2-5 (CSX) in feline right ventricular pressure overload. *Am J Physiol* 1998;274(5, Pt 2):H1569–H1573

- 28 Bishop JE, Rhodes S, Laurent GJ, Low RB, Stirewalt WS. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cardiovasc Res* 1994;28(10):1581–1585
- 29 Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009;120(20):1951–1960
- 30 Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, et al. Metabolic gene remodeling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail* 2013;6(1):136–144
- 31 Kay JM, Keane PM, Suyama KL, Gauthier D. Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. *Thorax* 1982;37(2):88–96
- 32 Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(5):H2424–H2430
- 33 Akhavan F, St-Michel EJ, Seifert E, Rohlicek CV. Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. *J Appl Physiol* 2007;103(1):287–295
- 34 Tada Y, Laudi S, Haral J, et al. Murine pulmonary response to chronic hypoxia is strain specific. *Exp Lung Res* 2008;34(6):313–323
- 35 Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, et al. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J Appl Physiol* 1987;62(2):821–830
- 36 Crossno JT Jr, Garat CV, Reusch JEB, et al. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(4):L885–L897
- 37 Dempsey EC, Wick MJ, Karoor V, et al. Neprilysin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *Am J Pathol* 2009;174(3):782–796
- 38 Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182(5):652–660
- 39 Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J* 2001;15(2):427–438
- 40 Abe K, Toba M, Alzoubi A, et al. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010;121(25):2747–2754
- 41 Sakao S, Tatsumi K. The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Respiration* 2011;81(3):253–261
- 42 Sukbuntherng J, Cropp G, Hannah A, Wagner GS, Shawver LK, Antonian L. Pharmacokinetics and interspecies scaling of a novel VEGF receptor inhibitor, SU5416. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(12):1629–1636
- 43 Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, et al. Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(12):1280–1289
- 44 Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, et al. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulm Circ* 2012;2(4):434–442
- 45 Engelfriet PM, Duffels MG, Möller T, et al. Pulmonary arterial hypertension in adults born with a heart septal defect: the Euro Heart Survey on adult congenital heart disease. *Heart* 2007;93(6):682–687
- 46 Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(1, Suppl):S43–S54
- 47 Hopkins WE, Waggoner AD. Severe pulmonary hypertension without right ventricular failure: the unique hearts of patients with Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol* 2002;89(1):34–38
- 48 Rendas A, Lennox S, Reid L. Aorta-pulmonary shunts in growing pigs. Functional and structural assessment of the changes in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979;77(1):109–118
- 49 De Canniere D, Stefanidis C, Brimiouille S, Naeije R. Effects of a chronic aortopulmonary shunt on pulmonary hemodynamics in piglets. *J Appl Physiol* 1994;77(4):1591–1596
- 50 Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, et al. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003;107(9):1329–1335
- 51 Yuan SM, Shinfeld A, Raanani E. The Blalock-Taussig shunt. *J Card Surg* 2009;24(2):101–108
- 52 Loukanov T, Geiger R, Agrawal R. Animal models related to congenital heart disease and clinical research in pulmonary hypertension. *Cardiology* 2010;116(1):18–25
- 53 Gorenflo M, Herpel E, Ullmann MV, et al. Pulmonary vascular changes in piglets with increased pulmonary blood flow and pressure. *Virchows Arch* 2007;450(6):643–652
- 54 Thambo JB, Roubertie F, De Guillebon M, et al. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2012;154(1):38–42
- 55 Kuehne T, Saeed M, Gleason K, et al. Effects of pulmonary insufficiency on biventricular function in the developing heart of growing swine. *Circulation* 2003;108(16):2007–2013
- 56 Basquin A, Pineau E, Galmiche L, Bonnet D, Sidi D, Boudjemline Y. Transcatheter valve insertion in a model of enlarged right ventricular outflow tracts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139(1):198–208
- 57 Pengo V, Lensing AW, Prins MH, et al; Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study Group. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2004;350(22):2257–2264
- 58 Madani MM, Auger WR, Pretorius V, et al. Pulmonary endarterectomy: recent changes in a single institution's experience of more than 2,700 patients. *Ann Thorac Surg* 2012;94(1):97–103, discussion 103
- 59 Jenkins DP, Madani M, Mayer E, et al. Surgical treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2013;41(3):735–742
- 60 Mercier O, Tivane A, Raoux F, et al. Reliable piglet model of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A2415
- 61 Guihaire J, Haddad F, Mercier O, et al. The relationship between right ventricular-pulmonary arterial coupling and right ventricular function in a porcine model of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A3472
- 62 Brooks H, Kirk ES, Vokonas PS, Urschel CW, Sonnenblick EH. Performance of the right ventricle under stress: relation to right coronary flow. *J Clin Invest* 1971;50(10):2176–2183
- 63 Guihaire J, Haddad F, Mercier O, et al. Improvement in right ventricular function after surgical treatment of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension in a porcine model. *J Heart Lung Transplant* 2012;31(4):S79–S80
- 64 West J, Fagan K, Steudel W, et al. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res* 2004;94(8):1109–1114
- 65 Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012;122(12):4306–4313
- 66 Beppu H, Malhotra R, Beppu Y, Lepore JJ, Parmacek MS, Bloch KD. BMP type II receptor regulates positioning of outflow tract and remodeling of atrioventricular cushion during cardiogenesis. *Dev Biol* 2009;331(2):167–175

- 67 de Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, van Bel F, Baan J. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(1):H100–H105
- 68 Watts JA, Marchick MR, Kline JA. Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension. *J Card Fail* 2010;16(3):250–259
- 69 Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* 2009;135(3):794–804
- 70 Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997;100(9):2315–2324
- 71 Bull TM, Coldren CD, Geraci MW, Voelkel NF. Gene expression profiling in pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(1):117–120
- 72 Waehre A, Vistnes M, Sjaastad I, et al. Chemokines regulate small leucine-rich proteoglycans in the extracellular matrix of the pressure-overloaded right ventricle. *J Appl Physiol* 2012;112(8):1372–1382
- 73 Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J* 2012;40(6):1555–1565
- 74 Rondelet B, Dewachter C, Kerbaul F, et al. Prolonged overcirculation-induced pulmonary arterial hypertension as a cause of right ventricular failure. *Eur Heart J* 2012;33(8):1017–1026
- 75 Tuder RM, Davis LA, Graham BB. Targeting energetic metabolism: a new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185(3):260–266
- 76 Ruiter G, Ying Wong Y, de Man FS, et al. Right ventricular oxygen supply parameters are decreased in human and experimental pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2013;32(2):231–240
- 77 Wrigley BJ, Lip GY, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011;13(11):1161–1171
- 78 Watts JA, Gellar MA, Obratzova M, Kline JA, Zagorski J. Role of inflammation in right ventricular damage and repair following experimental pulmonary embolism in rats. *Int J Exp Pathol* 2008;89(5):389–399
- 79 Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998;97(14):1382–1391
- 80 Nagendran J, Archer SL, Soliman D, et al. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 2007;116(3):238–248
- 81 Nagendran J, Sutendra G, Paterson I, et al. Endothelin axis is upregulated in human and rat right ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2013;112(2):347–354
- 82 Kerbaul F, Brimiouille S, Rondelet B, Dewachter C, Hubloue I, Naeije R. How prostacyclin improves cardiac output in right heart failure in conjunction with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(8):846–850
- 83 Zhao L, Chen CN, Hajji N, et al. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation* 2012;126(4):455–467
- 84 Bogaard HJ, Mizuno S, Hussaini AA, et al. Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(10):1402–1410
- 85 de Man FS, Tu L, Handoko ML, et al. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(8):780–789
- 86 Umar S, de Visser YP, Steendijk P, et al. Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(5):H1606–H1616
- 87 Bove T, Bouchez S, De Hert S, et al. Acute and chronic effects of dysfunction of right ventricular outflow tract components on right ventricular performance in a porcine model: implications for primary repair of tetralogy of fallot. *J Am Coll Cardiol* 2012;60(1):64–71
- 88 Kerbaul F, Gariboldi V, Giorgi R, et al. Effects of levosimendan on acute pulmonary embolism-induced right ventricular failure. *Crit Care Med* 2007;35(8):1948–1954
- 89 Nagendran J, Gurtu V, Fu DZ, et al. A dynamic and chamber-specific mitochondrial remodeling in right ventricular hypertrophy can be therapeutically targeted. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136(1):168–178, e1–e3
- 90 Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, et al. Sildenafil enhances systolic adaptation, but does not prevent diastolic dysfunction, in the pressure-loaded right ventricle. *Eur J Heart Fail* 2012;14(9):1067–1074
- 91 Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, et al. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc Res* 2009;82(1):30–39
- 92 Mouchaers KT, Schalij I, Versteilen AM, et al. Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297(1):H200–H207
- 93 Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, et al. Antiremodeling effects of iloprost and the dual-selective phosphodiesterase 3/4 inhibitor tolfenetrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004;94(8):1101–1108
- 94 van Albada ME, Berger RM, Niggebrugge M, van Veghel R, Cromme-Dijkhuis AH, Schoemaker RG. Prostacyclin therapy increases right ventricular capillarisation in a model for flow-associated pulmonary hypertension. *Eur J Pharmacol* 2006;549(1–3):107–116
- 95 Yuyama H, Koakutsu A, Fujiyasu N, et al. Effects of selective endothelin ET(A) receptor antagonists on endothelin-1-induced potentiation of cancer pain. *Eur J Pharmacol* 2004;492(2–3):177–182
- 96 Ahn BH, Park HK, Cho HG, et al. Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats. *J Korean Med Sci* 2003;18(5):641–648
- 97 Piao L, Fang YH, Cadete VJ, et al. The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *J Mol Med (Berl)* 2010;88(1):47–60
- 98 Redout EM, van der Toorn A, Zuidwijk MJ, et al. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298(3):H1038–H1047
- 99 Kojonazarov B, Sydykov A, Pullamsetti SS, et al. Effects of multi-kinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling. *Int J Cardiol* 2012
- 100 Mouchaers KT, Schalij I, de Boer MA, et al. Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur Respir J* 2010;36(4):800–807

2. ANALYSE ECHOCARDIOGRAPHIQUE DU VENTRICULE DROIT CHEZ L'ANIMAL

a) Echographes et protocoles d'acquisition

Au *Laboratoire de Recherche Chirurgicale* du Centre Chirurgical Marie Lannelongue, nous avons utilisé l'échographe Vivid E9® (General Electric Medical System, Milwaukee, USA) afin de réaliser des acquisitions trans-thoraciques sur le modèle porcin HYPPE grâce à une collaboration avec l'unité Inserm U999 (Pr Humbert). L'échocardiographie était réalisée avant chaque procédure chirurgicale après induction anesthésique selon le protocole précédemment décrit. Les animaux étaient placés sous ventilation artificielle en FiO₂ 100% et chaque boucle d'échographie était enregistrée en télé-expiration, en mode 2D et en Doppler tissulaire dans les 3 incidences suivantes : apicale sous-xyphoïdienne (vue 4 ou 5 cavités), parasternale droite grand axe et parasternale droite petit axe. Un enregistrement Doppler pulsé et couleur des flux tricuspide et pulmonaire était également effectué en synchronisation avec l'enregistrement de l'activité électrique cardiaque. Les boucles étaient analysées dans un second temps alternativement par deux opérateurs (JG et FH) sur une console de travail dédiée (EchoPAC Dimension'06, General Electric Medical System). Les indices morphologiques et fonctionnels du VD étaient colligés dans une base de données informatisée.

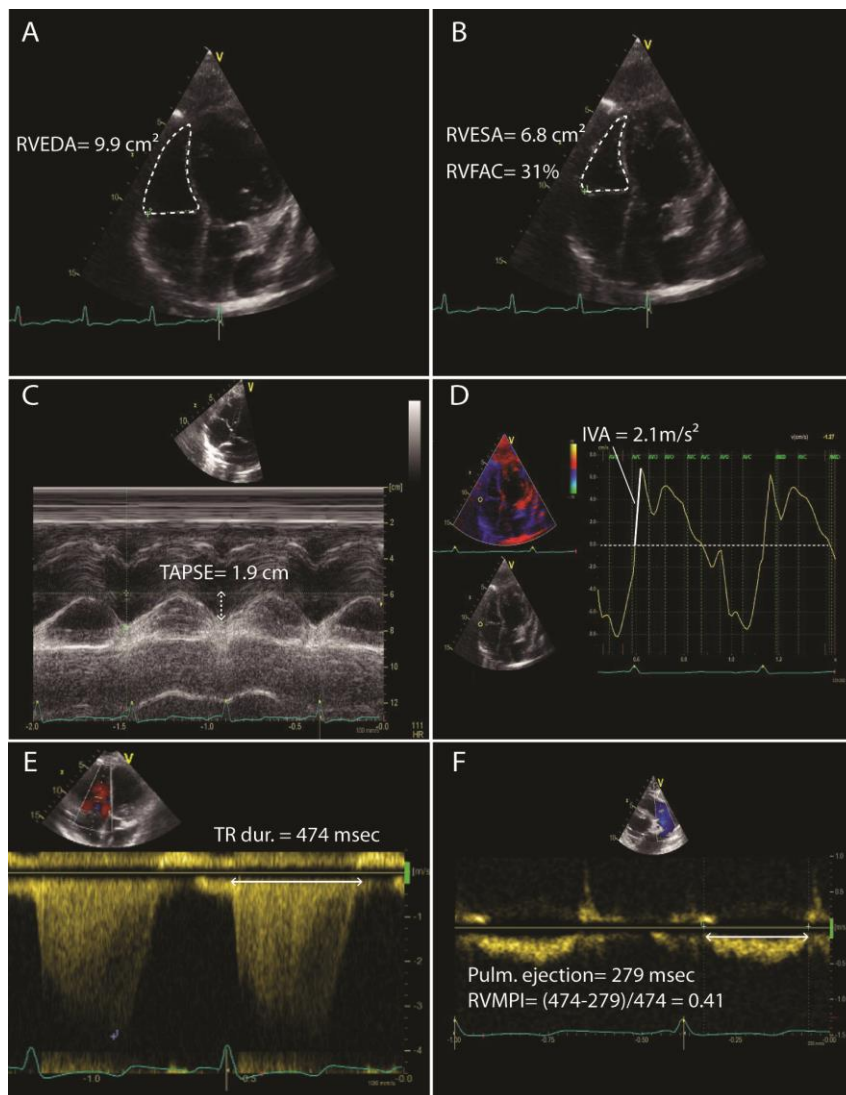
Au *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* de Hambourg, nous avons effectué les échocardiographies (Vevo 2100, VisualSonics Inc., Toronto, Canada) à 3 semaines sur les rats dans des conditions de sédation légère par inhalation d'isoflurane (1 à 2%). Les boucles étaient enregistrées en incidence apicale (vue 4 cavités) en mode 2D. Les autres incidences (notamment parasternales) étaient techniquement difficiles à acquérir et non interprétables secondairement. L'ensemble des boucles étaient analysées sur une console de travail dédiée pour les mesures morphologiques et fonctionnelles (VisualSonics Inc.).

b) Mesure des indices géométriques et fonctionnels

Le remodelage morphologique du VD était tout d'abord quantifié par la mesure de l'épaisseur de la paroi libre du VD en télédiastole. La surface télédiastolique du VD en incidence 4 cavités

était également mesurée et rapportée à la surface télédiastolique du VG. Après mesure de la surface télésystolique du VD, le right ventricular fractional area change (RVFAC) était calculé selon la formule : (surface télédiastolique – surface télésystolique) / surface télédiastolique. Il s'agit d'un indice de fonction systolique reproductible qui est bien corrélé à la survie des patients dans l'HTP.^{21, 119} Le tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), indice de fonction systolique du VD couramment utilisé, était mesuré soit en mode TM au niveau de la partie latérale de l'anneau tricuspide, soit en mode 2D en faisant la différence des distances base-apex en télésystole et télédiastole. L'indice de performance myocardique du VD (IPMVD) ou indice de Tei est un indice de la fonction ventriculaire globale, systolique et diastolique, indépendant de la géométrie du VD. Il est calculé par le ratio (durée de contraction isovolumique - durée de relaxation)/ durée de contraction isovolumique, les durées étant mesurée à partir du signal Doppler pulsé pulmonaire et tricuspide. Bien qu'initialement décrit comme étant un indice fiable de contractilité ventriculaire, il s'avère en fait que l'IPMVD soit dépendant des conditions de charge.¹²⁰ Un autre indice systolique du VD rapporté par Vogel et al en 2002, l'accélération de la contraction isovolumique (IVA), serait davantage indépendant du remplissage.¹²¹⁻¹²³ Cet indice se mesure en Doppler tissulaire au niveau de la base du VD en regard de l'anneau tricuspide et dans notre expérience nous avons eu recours au post-processing pour mesurer la pente d'accélération de la contraction isovolumique et également le pic de vélocité au niveau de l'anneau tricuspide (onde S). La mesure de ces différents indices fonctionnels est illustrée par la *Figure 5*.

Figure 5. Images et signaux échocardiographiques d'intérêt pour évaluer la fonction ventriculaire droite. RVEDA, right ventricular end-diastolic area ; RVESA, right ventricular end-systolic area ; RVFAC, right ventricular fractional area change; TR, tricuspid regurgitation; RVMPI, right ventricular myocardial performance index; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; IVA, isovolumic acceleration.



3. CATHETERISME CARDIAQUE DROIT

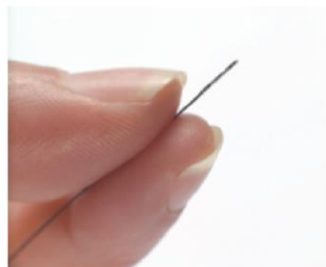
Lors de chaque procédure chirurgicale sur le modèle HYPPE, un introducteur de 8 French était mis en place dans le confluent veineux brachio-céphalique gauche par voie percutanée (Radiofocus Introducer II, Terumo®). Un cathéter de Swan-Ganz de 7,5 French (Edwards Lifesciences®, Irvine, USA) était ensuite introduit dans les cavités cardiaques droites et son extrémité était placée dans l'AP droite, puis dans le lobe inférieur droit sous contrôle radioscopique. La pression veineuse centrale et la PAP systolique, diastolique et moyenne étaient relevées en télé-expiration sous FiO₂ 21%. Le débit cardiaque était mesuré par la méthode de thermodilution (Vigilance Monitor VGS2V, Edwards Lifesciences®, Irvine, USA). Le calcul des résistances pulmonaires totales en dynes.s.cm⁻⁵ était obtenu par le produit de la PAP moyenne (en mm Hg) et du facteur 80, rapporté au débit cardiaque (en L/min). Nous n'avons pas retenu comme valeur de l'impédance pulmonaire les RVP mais les résistances pulmonaires totales car la valeur de la pression capillaire pulmonaire est effet aléatoire sur le modèle HYPPE. La néo-angiogénèse systémique développée en aval des territoires obstrués va considérablement augmenter le débit dans la circulation bronchique et ainsi majorer la pression capillaire pulmonaire.^{124, 125}

Sur le modèle d'hypertension pulmonaire angioproliférative de Hambourg, le cathétérisme ventriculaire droit était réalisé en transapical par une approche à thorax ouvert au moment de l'enregistrement des boucles pression-volume par le cathéter d'admittance, tel que décrit ci-dessous et illustré par la *Figure 5*.

Figure 5. Mise en place d'une sonde d'admittance dans le ventricule droit d'un rat à thorax ouvert en ventilation assistée au *TSI Lab* de Hambourg (ADVantage system, Scisense, London, Canada).



Console de calibration
(ADVantage system)



Sonde d'admittance 1,2 Fr
(Scisense, London, Canada)



Mise en place de la sonde d'admittance transapicale dans le VD du rat

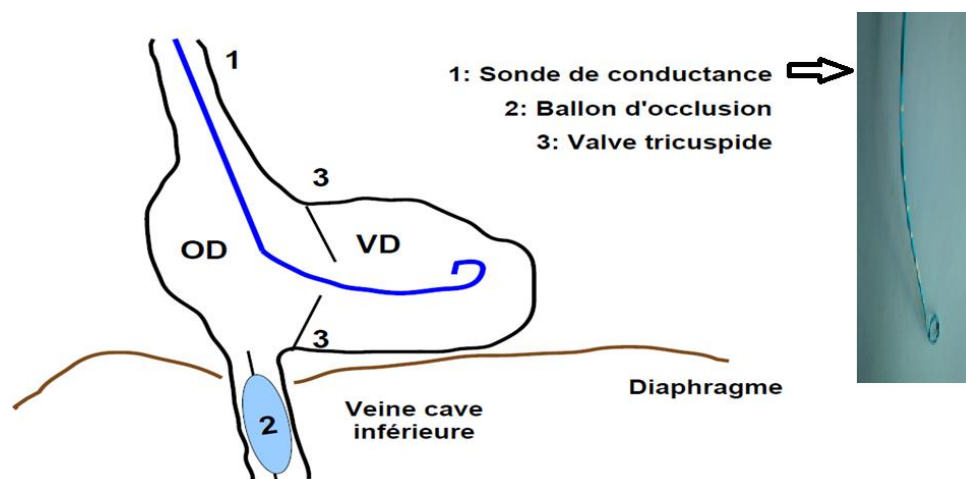
4. BOUCLES PRESSION-VOLUME DU VENTRICULE DROIT

a) Technique de conductance chez le porc

Un cathéter de conductance de 7 Fr (4 Fr pour les animaux de moins de 30 kg) était placé dans le VD par l'intermédiaire de l'introducteur veineux préalablement mis en place par voie percutanée (CD Leycom, Zoetermeer, Pays-Bas) (*Figure 6*). Le cathéter était connecté à une interface de pression (Sentron pressure interface) et à un module de transmission du signal électrique pour l'analyse des volumes. Les données étaient recueillies en temps réel grâce à un logiciel dédié (Conduct NT, CD Leycom). La calibration du cathéter était nécessaire puisque la méthode est basée sur le concept de proportionnalité entre la conductance électrique sanguine et les volumes intra-cardiaques. Le cathéter permettait un enregistrement continu électrocardiographique endocavitaire et la pression intra-ventriculaire était mesurée par un capteur barométrique ultrasensible. Douze électrodes sont disposées sur le cathéter de conductance. Le capteur de pression est placé entre les 3^e et 4^e électrodes. Un champ électrique est généré entre les 2 électrodes les plus distales et les 2 électrodes les plus proximales. Les distances entre chacune des 8 autres électrodes constituent 7 segments de conductance pour la mesure en continu du signal électrique propagé dans le VD. La conversion de la conductance endocavitaire en signal de volume tient compte de la distance entre chaque électrode de la sonde, de la résistivité du sang, de la conductance des structures extra-cardiaques et du facteur de correction alpha. La résistivité du sang est mesurée à partir d'un échantillon sanguin de 5 ml non hépariné prélevé au niveau de la veine fémorale. La distance entre chaque électrode est de 6 ou 10 mm pour les cathéters de 4 Fr, et de 8 ou 10 mm pour les cathéters de 7 Fr. Le choix s'oriente en fonction du poids de l'animal et du volume du VD apprécié par l'échographie cardiaque. Il est nécessaire qu'au moins trois segments se trouvent dans la cavité ventriculaire droite de façon à obtenir des mesures fiables des volumes du VD. La mesure du volume de conductance extra-cardiaque, appelé volume parallèle, est obtenue après injection d'un bolus de 10 ml de sérum salé hypertonique à 5%.¹²⁶ Après correction de la conductance parallèle, le volume mesuré par le cathéter de conductance est proportionnel au volume ventriculaire réel.¹²⁶ Cependant la méthode de conductance sous-estime le volume endocavitaire selon un pourcentage variable. Pour corriger cette approximation, le

volume d'éjection systolique (VES) obtenu par conductance doit être comparé au VES obtenu simultanément par une autre méthode. Le rapport des 2 mesures définit le facteur de correction alpha.¹²⁶ Nous utilisons une méthode de mesure du débit cardiaque par thermodilution transpulmonaire (PiCCO system, Pulsion Medical System, Munich, Allemagne). Un cathéter artériel était introduit dans l'artère fémorale droite. Les acquisitions étaient effectuées durant 5 cycles cardiaques consécutifs sur un animal en pause télé-expiratoire de façon à s'affranchir des variations de précharge induites par la ventilation mécanique.

Figure 6. Représentation schématique de la position du cathéter de conductance (bleu) dans le ventricule droit pour enregistrement des boucles pression-volume chez le porc (modèle HYPPE). Un second cathéter à ballonnet est introduit par la veine fémorale droite et monté sur guide sous contrôle radioscopique jusqu'à l'entrée de l'oreillette droite de telle sorte que le ballon puisse totalement stopper le retour veineux provenant de la veine cave inférieure.



Toutes les données étaient enregistrées puis analysées sur le logiciel Leycom Conduct NT® (Conduct NT, CD Leycom, Zoetermeer, Pays-Bas). Une boucle pression-volume était composée de 4 segments représentant chacune des phases d'un cycle cardiaque: la relaxation isovolumique, le remplissage passif, la contraction isovolumique et l'éjection. L'aire sous la boucle représentait le travail mécanique externe généré par le VD, également appelé stroke work (SW).¹²⁶ L'étude des relations pression-volume télésystoliques permettait d'établir un index de contractilité ventriculaire: l'élastance ventriculaire télésystolique (Ees). Elle était obtenue par acquisition des boucles en

s'affranchissant de la précharge du VD par occlusion transitoire de la veine cave inférieure.¹²⁶ Un cathéter à ballonnet (Tyshak® 20 mm; NuMED, Inc, Hopkinton, New York, USA) était ainsi introduit par la veine fémorale droite. L'inflation du ballon à l'aide de 10 ml de produit de contraste iodé (Ioméron®, 350 mg d'iode/ml) était effectuée à l'aplomb du diaphragme, en regard de l'abouchement des veines sus-hépatiques, sous contrôle radioscopique (Figure 6). L'occlusion de la veine cave inférieure provoquait le décalage vers le bas et la gauche des boucles pression-volume successives. La pente de la droite joignant chaque point télésystolique déterminait Ees (Figure 7).

Figure 7. Enregistrement simultané des signaux de pression et volume du ventricule droit chez le porc (modèle HYPPE). Les boucles pression-volume sont acquises au moment de l'occlusion transitoire de la veine cave inférieure permettant de construire la droite de relation pression-volume télésystolique (en bleu) dont la pente définit l'élastance télésystolique du VD (Ees). L'équation de la courbe de relation télédiastolique (en vert) permet de calculer la compliance du ventricule.

dP/dt, dérivée première de la pression en fonction du temps.



Après calibration par le facteur alpha, les valeurs de pression, volume, dP/dt et E_{es} étaient moyennées à partir de 3 enregistrements consécutifs au cours de la même procédure. Les boucles influencées par la respiration spontanée de l'animal étaient exclues de l'analyse. Une seconde lecture en aveugle des boucles était effectuée à distance par le même opérateur (JG) en respectant les mêmes critères de qualité.

b) Technique d'admittance chez le rat

La technique d'acquisition des boucles pression-volume par admittance considère le muscle comme une entité à conductance propre. Elle repose sur une relation non linéaire entre la conductance et le volume permettant de prendre en compte les variations de conductance parallèle au cours du cycle cardiaque. L'enregistrement des boucles pression-volume était effectué sous anesthésie générale de l'animal (isoflurane inhalé à 2% et buprénorphine sous-cutanée 0,5 $\mu\text{g/kg}$). L'approche à thorax ouvert pour ponction trans-apicale du VD nécessitait une ventilation mécanique via une sonde de trachéotomie introduite par cervicotomie médiane (*Figure 5*). La technique d'enregistrement par admittance ne requiert pas toutes les étapes de calibration contrairement à la traditionnelle méthode de conductance. Il suffit de rentrer la valeur prédite du VES de l'animal, de choisir le mode de résistivité (myocarde sain, ischémique ou infiltré) et de commencer les enregistrements. Une simple calibration de la pression est nécessaire afin de définir la valeur zéro. La technique d'admittance mesure à la fois les propriétés de conduction et la capacitance du sang et du muscle cardiaque. En appliquant la théorie du champ électrique de Faraday, cette méthode permet de distinguer l'admittance du muscle de l'admittance du sang. Dans ce modèle, le sang est uniquement une composante résistive, tandis que le muscle possède à la fois une résistance et une capacitance. Les principaux avantages et inconvénients des méthodes de conductance et admittance pour l'analyse des boucles pression-volume sont résumés dans le *Tableau 7*.

Tableau 7. Principales caractéristiques des méthodes de conductance et d'admittance pour l'enregistrement et l'analyse des boucles pression-volume.

	Conductance	Admittance
Volume absolu (mL ou μ L)	non	oui
Volume parallèle	oui	non
Mesure de la résistivité du sang	oui	non
Mesures en temps réel	non *	oui
Bolus de sérum salé hypertonique 5%	oui	non
Autocalibration	non	oui
Feedback sur la position de la sonde	non	oui §

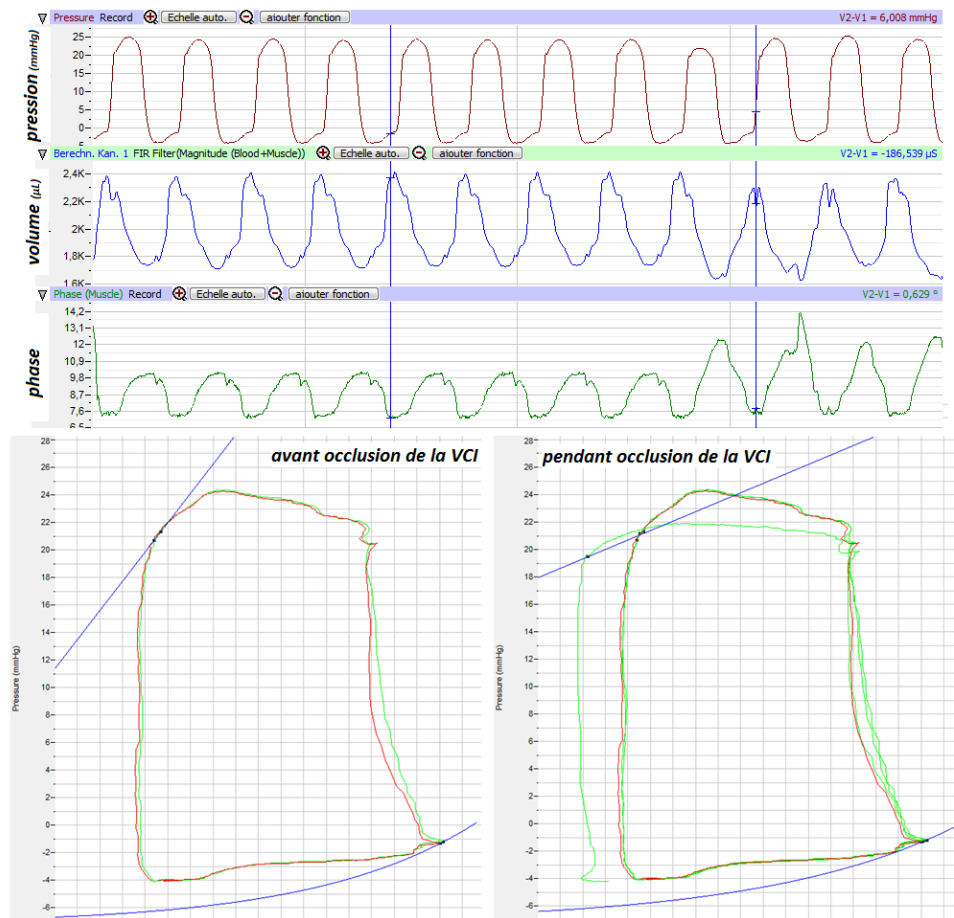
* La calibration par le facteur alpha repose sur une mesure à un instant t . Or le facteur alpha peut varier pendant la durée d'acquisition successive des boucles pression-volume. Théoriquement, il faudrait calculer le facteur alpha avant chaque enregistrement d'une série de boucles, ce qui nécessiterait des injections répétées de sérum salé hypertonique et prolongerait considérablement la durée des acquisitions en plus d'augmenter la volémie.

§ Le signal d'onde phase musculaire transmis par la sonde d'admittance reflète sa position dans la cavité ventriculaire en temps réel. Cette phase est d'autant plus élevée que la sonde est proche du myocarde et donc mal positionnée. Par la méthode de conductance, le positionnement du cathéter peut être optimisé dans le ventricule sous contrôle scopique en fonction du signal de volume et de pression (il ne doit pas y avoir de signal atrial).

La droite de relation linéaire télésystolique du VD était obtenue par occlusion à ciel ouvert de la veine cave inférieure par une pince non traumatique durant une phase de pause respiratoire (*Figure 8*). La principale limite de la méthode d'admittance que nous avons rencontrée dans notre expérience était la fiabilité du signal de volume. Il était fréquemment perturbé par des artéfacts,

voire impossible à interpréter et ne permettait pas toujours de construire des boucles pression-volume analysables. La mesure des variables hémodynamiques (pressions et volumes du VD, Ees et Ea) était réalisée et moyennée selon la même méthode que nous avons employée pour les mesures par conductance.

Figure 8. Exemple d'enregistrement des signaux de pression et de volume par la technique d'admittance chez un rat témoin. Les boucles pression-volume sont enregistrées avant et pendant l'occlusion transitoire de la veine cave inférieure (VCI).



5. HISTOLOGIE

a) Morphométrie et immunofluorescence du ventricule droit chez le porc et le rat

Après sacrifice de l'animal (par injection systémique d'une dose létale de potassium chez le porc ; par exsanguination chez le rat), le massif cardiaque était rapidement explanté. Le VD et le VG étaient séparés et pesés afin de définir le poids relatif du VD ou ratio de Fulton (poids VD/poids [VG+septum]), indice objectif d'hypertrophie ventriculaire droite (normale <20%). Les tissus étaient rapidement fixés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 48 heures, puis étaient déshydratés durant 24 heures avant d'être placés dans un bloc de paraffine. Des sections tissulaires de 5 µm étaient effectuées sur les blocs de paraffine. Le remodelage myocardique était apprécié par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE), en mesurant la surface des cardiomyocytes dans la région sous-épicaudique sur un plan de section transverse de la paroi libre du VD. Vingt surfaces cellulaires choisies de façon aléatoire par champ étaient ainsi quantifiées par analyse numérisée au grossissement x400 en microscopie optique (Leica, Bensheim, Allemagne). La surface moyenne des cardiomyocytes pour un animal correspondait à la valeur moyenne obtenue après analyse de 5 champs par animal, soit le résultat moyenné de l'analyse de 100 surfaces cellulaires.

Sur le modèle d'HTP angioproliférative chez le rat, nous avons également effectué un immunomarquage des macrophages dans la paroi libre du VD. Les lames de myocarde ventriculaire droit étaient soumises à 3 étapes de lavage au tampon phosphate salin (PBS), puis elles étaient incubées pendant 20 minutes à dans une solution de révélation des épitopes (pH 9, DakoCytomation®, Glostrup, Danemark), puis refroidies à température ambiante pendant 45 minutes. Les lames étaient ensuite rincées dans un bain d'eau distillée, puis à nouveau soumises à un triple lavage au PBS. Un immunomarquage était alors réalisé par un anticorps primaire murin dirigé contre un antigène spécifique de la lignée monocyttaire chez le rat, le CD68 (dilution 1 :100, ab31630, Abcam®, Cambridge, Royaume-Uni). Après 30 minutes, les lames étaient rincées par un triple bain de PBS, puis soumises à un anticorps secondaire de chèvre dirigé contre l'anticorps primaire murin et marqué par un fluorochrome de longueur d'onde verte (dilution 1:1000, DakoCytomation®). Après 30 minutes, un triple rinçage au PBS était effectué. Un marquage

fluorescent final de l'ADN nucléaire était réalisé par du 4',6-Diamidino-2-Phénylindole (dilution 1 :1000, DAPI). Après un rinçage à l'eau distillée, les lames étaient montées avec une colle spécifique permettant la lecture en fluorescence (Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen®, Life Technologies, Darmstadt, Allemagne). Le taux de macrophages/champ était quantifié par le ratio du nombre de cellules CD68+ sur le nombre total de cellules (DAPI+) observées en immunofluorescence au microscope confocal (Universitätsklinikum Eppendorf Microscopy Imaging Facilities (UMIF), Hambourg, Allemagne). Cinq champs par animal étaient ainsi analysés et le taux de macrophages par champ était moyenné pour chaque animal. Les résultats étaient analysés avec le logiciel Volocity (version 6.2, PerkinElmer, Waltham, USA).

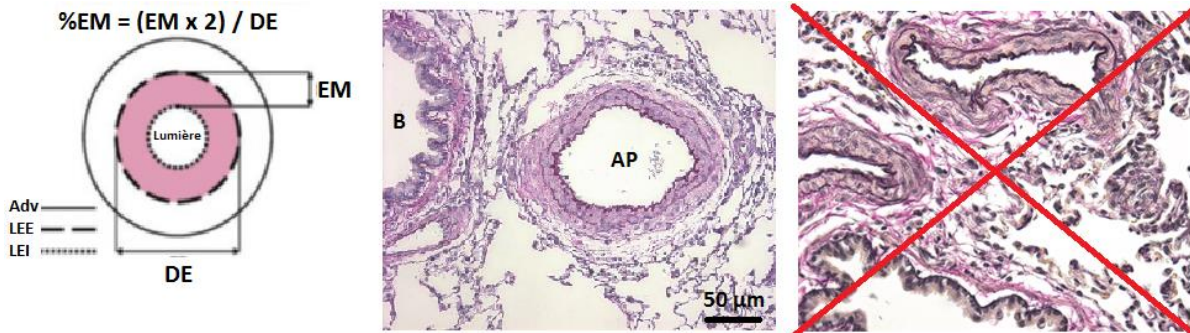
b) Morphométrie et immunohistochimie des artères pulmonaires chez le rat

Chez les rats, les poumons étaient rapidement explantés en insufflation après exsanguination par la veine cave inférieure. Les lames pour analyse histologique étaient préparées comme précédemment décrit pour les lames de VD. Une coloration des fibres élastiques par la méthode de Van Gieson était réalisée par bains successifs dans une solution d'hémaroxylène de Weigert et de picrofuchsin de Gieson (Elastica van Gieson kit, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). Les noyaux apparaissaient en brun foncé, les fibres élastiques et notamment les limitantes élastiques des AP en violet foncé, les fibres de collagène en rouge et les fibres musculaires en jaune. L'obstruction luminale des artérioles pulmonaires, dont le diamètre était compris entre 50 et 100 µm, était quantifiée selon la méthode publiée par Rondelet et al.¹⁰⁴ L'épaisseur de la média était rapportée au plus grand diamètre total du vaisseau microscopie optique au grossissement x400 (Leica, Bensheim, Allemagne), selon la formule:

$$\%EM = (EM \times 2) / DE \times 100$$

où EM est l'épaisseur de la média, DE est le diamètre externe de l'artériole délimité par la limitante élastique externe, et DI le diamètre interne de l'artériole délimité par la limitante élastique interne (Figure 9).

Figure 9. Analyse morphométrique des artères pulmonaires chez le rat (coloration Elastica van Gieson, x400). Seules les artérioles pulmonaires (AP) situées à proximité d'une bronchiole (B) et mesurant 50 à 100 µm de diamètre étaient considérées pour l'analyse. Les AP en section longitudinale (image de droite) étaient exclues de l'analyse. Adv, adventice ; LEE, limitante élastique externe ; LEI, limitante élastique interne. D'après Rondelet et al.¹⁰⁴



Les macrophages infiltrant la paroi des artérioles pulmonaires étaient marqués en immunohistochimie par un anticorps primaire murin dirigé contre un antigène spécifique de la lignée monocyttaire chez le rat, le CD68 (dilution 1 :100, ab31630, Abcam®). Un marquage enzymatique venait ensuite révéler l'anticorps primaire anti-CD68. Les macrophages apparaissaient en rouge. Le taux de macrophages infiltrant la paroi des artérioles pulmonaires étaient quantifié numériquement en microscopie optique selon le ratio de la circonférence occupée par les macrophages sur la circonférence totale de l'artériole.

6. BIOLOGIE MOLECULAIRE

a) Sélection et préservation des tissus d'intérêt

Nous avons effectué ces analyses moléculaires sur le myocarde ventriculaire droit dans plusieurs études sur le modèle porcin HYPPE après sacrifice de l'animal. Le protocole appliqué était le même pour chaque étude. Le fragment tissulaire était prélevé systématiquement sur la portion apicale de la paroi libre du VD, tandis que la portion basale était destinée pour l'analyse histologique. Aussitôt le poids de la paroi libre du VD pesée, la portion basale était découpée et mise dans un tube Eppendorf et plongé dans l'azote liquide à -80°C.

b) Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux était effectuée par broyage des prélèvements myocardiques congelés à -80°C. La suspension était récupérée après centrifugation à 4°C. Après lavage à l'éthanol froid à 75%, le culot était séché et repris dans de l'eau RNase Free (RNase free, Sigma Aldrich, France). La concentration en ARN était déterminée par la mesure de la densité optique à 260 nm par le Nanodrop™ 1000. Les ARN étaient ensuite déposés sur un gel d'agarose afin d'évaluer leur intégrité puis conservés à -80°C.

c) Transcription inverse

La transcription inverse des ARNm en ADNc est effectuée à partir d'1 µg d'ARN en utilisant le coffret QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, les Ulis, France). Les produits de RT sont conservés à -20°C.

d) Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (RtqPCR)

Les PCR quantitatives étaient réalisées sur le Step one plus® (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). L'expression des gènes d'intérêt était mise en évidence à l'aide de sondes Taqman spécifiques: la référence Ss03392423_m1 pour le gène de la chaîne lourde bêta myosine 7 (MYH7) et la référence Ss03392411_m1 pour le gène du brain natriuretic peptide (BNP) (Applied Biosystems). La référence 4319413E était employée comme gène de référence.

7. ANALYSES STATISTIQUES

Seuls les animaux ayant atteint le terme de l'expérimentation (12 semaines pour le modèle HYPPE et 4 semaines pour le modèle angioprolifératif) étaient inclus dans l'analyse statistique finale pour chaque étude (minimum de 6 animaux par groupe). Les résultats étaient exprimés en moyenne $\pm$ dérivations standards pour les variables de distribution normale. L'analyse statistique reposait sur une analyse de la variance à double voie (ANOVA), suivie d'un test de Fisher pour les comparaisons inter-groupes. Pour l'étude des relations entre les variables, une approximation linéaire était recherchée. Les analyses ont été réalisées avec les logiciels de biostatistiques Statview version 5 (Abacus Concept, Berkeley, USA) et Prism version 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Les graphiques et histogrammes étaient réalisés avec le logiciel Prism version 6. Les différences entre paramètres pour lesquelles $p < 0,05$ étaient considérées comme significatives.

TRAVAUX DE RECHERCHE

1. HYPOTHESES

L'HTP chronique conduit à la dysfonction progressive du VD aboutissant à l'insuffisance cardiaque globale, puis au décès du patient malgré les progrès considérables de la pharmacologie au cours des vingt dernières années.¹²⁷ Avant l'installation de l'insuffisance ventriculaire droite, une phase de compensation est observée et se traduit par un remodelage géométrique et une adaptation fonctionnelle du VD.^{1, 23, 127} La survie des patients dans l'HTP dépend ainsi de la capacité du VD à durablement faire face à l'élévation de sa postcharge.¹²⁷ Le mismatch entre la performance du VD et l'impédance de la circulation pulmonaire est le facteur prédictif majeur de décompensation cardiaque droite dans les maladies cardiopulmonaires. Les mécanismes impliqués dans la transition depuis l'hypertrophie myocardique compensée vers le remodelage inadapté sont méconnus.

Le couplage ventriculo-artériel est un bon reflet de la performance énergétique cardiaque. Grâce à l'analyse des boucles pression-volume dans le VD, nous sommes parvenus à étudier le couplage VD/AP chez l'animal. Dans les conditions physiologiques, le VD est efficacement couplé à la circulation pulmonaire. La surcharge de pression chronique dans le VD va provoquer progressivement le découplage ventriculo-artériel, traduisant l'inefficience de la pompe cardiaque droite à lutter contre une postcharge élevée. La morphologie complexe du VD rend difficile l'acquisition puis l'interprétation des boucles pression-volume en pratique clinique. Nous avons ainsi testé dans un premier temps sur un modèle porcin d'HTP chronique l'hypothèse que les indices fonctionnels échocardiographiques du VD reflètent davantage le couplage ventriculo-artériel que la performance contractile du VD. La plupart de ces indices ne sont pas indépendants des conditions de charge et notamment des variations d'impédance pulmonaire.¹²⁸

Les déterminants de la réponse du VD à l'exercice ou à un stress pharmacologique ne sont pas complètement définis par ailleurs. Or il s'agit d'un facteur pronostique majeur dans l'HTP chronique.¹²⁹⁻¹³¹ Nous pensons que la réserve contractile du VD est fortement associée au couplage ventriculo-artériel de repos, ainsi qu'aux variations d'expression génique au cours du

remodelage du VD. Nous avons ainsi étudié la réponse du VD à un stress pharmacologique par la dobutamine sur notre modèle porcin d'HTP chronique.

Autre enjeu majeur dans l'HTP, la récupération fonctionnelle du VD après normalisation de sa postcharge est souvent difficile à appréhender. Or il s'agit d'un critère prédictif de réponse au traitement principalement dans deux situations cliniques : la transplantation bi-pulmonaire pour HTP et l'endartériectomie pulmonaire pour hypertension pulmonaire post-embolique.¹³² Aucun indice fonctionnel, ni même aucun marqueur de remodelage structural ne permettent actuellement d'affirmer le caractère irréversible de la dysfonction ventriculaire droite dans l'HTP chronique. Une meilleure compréhension physiopathologique de cette adaptation est nécessaire. Nous avons donc modélisé sur l'animal le traitement chirurgical de l'HTP chronique et réalisé une approche comprehensive hémodynamique, fonctionnelle et moléculaire de la performance contractile et du couplage ventriculo-artériel dans cette maladie.

De récentes études expérimentales et cliniques mettent en évidence le rôle clé de l'inflammation dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque.⁸⁴ Si les neutrophiles sont retrouvés dans la paroi du VD précocement après une embolie pulmonaire aiguë, les macrophages seraient davantage impliqués dans le remodelage chronique du myocarde ventriculaire droit. Parmi les différents variants phénotypiques issus de la lignée monocyttaire, certains peuvent favoriser la réparation tissulaire. Cette polarisation fonctionnelle des macrophages dépend des conditions pathologiques de leur environnement.¹³³⁻¹³⁵ Nous avons étudié la relation entre l'infiltration macrophagique de la circulation cardio-pulmonaire et la dysfonction du VD chez le rat à partir du modèle d'HTP angioproliférative.

2. PREMIERE ETUDE

Publication :

Les indices non-invasifs de fonction ventriculaire droite sont davantage des marqueurs de couplage ventriculo-artériel que de contractilité ventriculaire: résultats expérimentaux sur un modèle de surcharge de pression chronique chez le porc

Non-invasive indices of right ventricular function are markers of ventricular-arterial coupling rather than ventricular contractility: insights from a piglet model of chronic pressure overload

Julien Guihaire, François Haddad, David Boulate, Benoît Decante, André Y. Denault, Joseph C. Wu, Philippe Hervé, Marc Humbert, Philippe Dartevelle, Jean-Philippe Verhoye, Olaf Mercier, Elie Fadel

Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2013;14:1140-9

Communication orale:

Indices de contractilité du ventricule droit dans un modèle d'hypertension pulmonaire chronique

Indices of right ventricular contractility in a model of chronic pulmonary hypertension

Julien Guihaire, François Haddad, Olaf Mercier, David Boulate, Benoît Decante,

Philippe Hervé, Philippe Dartevelle, Marc Humbert, Elie Fadel

International Society for Heart and Lung Transplantation, 33th Annual Meeting and Scientific Sessions

Montreal, Canada, 24 Avril 2013

Journal Heart Lung Transplant. 2013;32(4):S78 (abstract)

Etude expérimentale réalisée dans le *Laboratoire de Recherche Expérimentale* (Pr Fadel)

Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Inserm U999, Université Paris Sud.

Objectifs:

La persistance d'une postcharge élevée entraîne l'altération progressive de la performance du VD caractérisée notamment par le déclin de sa contractilité. Cette dysfonction systolique est corrélée à une réduction de survie à long terme chez les patients souffrant d'HTP chronique. L'évaluation fonctionnelle du VD par échocardiographie a donc un rôle pronostique dans cette maladie. Elle reste néanmoins techniquement difficile en raison de la morphologie et de la localisation rétrosternale du VD. La plupart des indices de fonction systolique couramment employés, tels que le tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE), la fraction d'éjection du VD ou bien encore le right ventricular fractional area change (RVFAC), sont par ailleurs fortement dépendants des conditions de charge ventriculaire et ne reflètent donc pas fidèlement la contractilité myocardique.

Plus récemment de nouveaux indices ont été proposés afin de mieux apprécier la performance contractile du VD tels que l'indice de Tei ou indice de performance myocardique du VD, ou bien encore les indices dérivés de l'analyse du signal Doppler tissulaire à la base du VD tel que l'accélération myocardique durant la phase de contraction isovolumique (IVA). Ces nouveaux indices n'ont cependant jamais été validés sur un modèle de surcharge de pression chronique du VD. Dans cette étude, nous avons mesuré sur notre modèle porcin d'hypertension pulmonaire post-embolique ces différents indices fonctionnels, puis nous avons analysé leur association avec le couplage ventriculo-artériel obtenu par la technique de conductance.

Résultats:

1. Résultats hémodynamiques

A 6 semaines, les porcs HYPPE présentaient une PAP moyenne et des résistances pulmonaires totales plus élevées que les animaux du groupe Sham (respectivement 35 ± 9 vs. 14 ± 2 mm Hg, $P < 0,01$; et $10,3 \pm 3,8$ vs. $4,4 \pm 0,9$ unités Wood, $P < 0,01$). Aucune différence n'était observée entre les groupes pour la fréquence cardiaque, l'index cardiaque et le volume d'éjection systolique indexé au repos. De même, les animaux ayant développé une HTP présentaient une augmentation significative de Ees ($0,55 \pm 0,09$ vs. $0,38 \pm 0,05$ mm Hg, $P < 0,01$) et du dP/dt max (542 ± 152 vs. 286 ± 88 mm Hg/s, $P < 0,01$), mais un moins bon couplage ventriculo-artériel ($0,68 \pm 0,17$ vs. $1,18 \pm 0,18$ mm Hg/mL, $P < 0,01$).

2. Résultats échocardiographiques

Les animaux du groupe hypertension pulmonaire présentaient une franche dilatation du VD associée à une dysfonction systolique avec une diminution du RVFAC, du TAPSE, de l'IVA et du pic de l'onde S, et une augmentation de l'indice de Tei. Nous avons observé une relation inverse entre Ees et les indices fonctionnels échographiques du VD ($0,26 < R^2 < 0,46$), si bien qu'une augmentation de Ees était associée à une altération de la fonction systolique du VD. La relation était encore plus forte entre l'indice de couplage (Ees/Ea) et les différents indices fonctionnels ($0,48 < R^2 < 0,85$).

Limites:

Les principales limites de cette étude sont l'utilisation d'un modèle animal à péricarde ouvert. L'absence de fermeture du péricarde préviendrait la défaillance précoce du VD et expliquerait que notre modèle soit davantage un modèle de remodelage compensé qu'un modèle de défaillance cardiaque droite. Par ailleurs, nous avons utilisé la méthode de conductance pour l'acquisition des boucles pression-volume. C'est une méthode invasive avec de nombreux biais de calibration. Pour une application clinique, il faudrait employer une autre stratégie pour apprécier la performance contractile, telle que l'IRM cardiaque couplée à la méthode du *single beat elastance*.

Conclusion:

Le principal résultat de cette étude expérimentale est que les indices fonctionnels non invasifs du VD reflètent davantage le couplage ventriculo-artériel que la contractilité du VD dans les conditions expérimentales de surcharge chronique de pression. Cette étude est la première à valider ces indices fonctionnels sur un modèle animal de remodelage ventriculaire. La valeur pronostique de ces résultats reste à valider sur de larges cohortes de patients.



Non-invasive indices of right ventricular function are markers of ventricular–arterial coupling rather than ventricular contractility: insights from a porcine model of chronic pressure overload

Julien Guihaire^{1†*}, Francois Haddad^{2†}, David Boulate¹, Benoît Decante¹, Andre Y Denault³, Joseph Wu², Philippe Hervé¹, Marc Humbert^{4,5,6}, Philippe Dartevielle¹, Jean-Philippe Verhoye⁷, Olaf Mercier¹, and Elie Fadel¹

¹Laboratory of Surgical Research and Inserm U999, University of Paris Sud, University of Paris XI, Marie Lannelongue Hospital, 133 avenue de la Résistance, Le Plessis Robinson, France; ²Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University, Palo Alto, CA, USA; ³Division of Anesthesiology, University of Montreal, Quebec, Montreal, Canada; ⁴Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, University of Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France; ⁵Faculté de médecine, AP-HP, Kremlin-Bicêtre, France; ⁶Inserm U999, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson, France; and ⁷Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University of Rennes 1, Rennes, France

Received 7 February 2013; revised 2 April 2013; accepted after revision 21 April 2013

Aims

To investigate the physiological correlates of indices of RV function in a model of chronic pressure overload.

Methods and results

Chronic pulmonary hypertension (PH) was induced in piglets by ligation of the left pulmonary artery (PA) followed by weekly embolization of right lower lobe arteries for 5 weeks (the PH group, $n = 11$). These animals were compared with sham-operated animals (controls, $n = 6$). At 6 weeks, a subgroup of five PH pigs underwent surgical reperfusion of the left lung and four others were followed until 12 weeks without treatment. Right ventricular function was assessed using echocardiography and conductance catheter measurements. At 6 weeks, mean PA pressure was higher in PH group compared with controls (35 ± 9 vs. 14 ± 2 mmHg, $P < 0.01$). Although RV elastance (Ees) increased at 6 weeks in the PH group (0.55 ± 0.09 vs. 0.38 ± 0.05 mmHg/mL, $P < 0.001$), ventricular–arterial coupling measured by the ratio of Ees on PA elastance (Ea) was decreased (0.68 ± 0.17 vs. 1.18 ± 0.18 , $P < 0.001$). There was a strong direct relationship between Ees/Ea and indices of RV function, while relationship between Ees and indices of RV function was moderate. Changes in indices of RV function with time and after left lung reperfusion were associated with changes in Ees/Ea.

Conclusion

Usual indices of RV function are associated with ventricular–arterial coupling rather than with ventricular contractility in a model of chronic pressure overload.

Keywords

Pulmonary hypertension • Right ventricle • Ventricular function • Ventricular–arterial coupling • Animal model • Echocardiography

Introduction

Right ventricular failure (RVF) is the main cause of morbidity in pulmonary hypertension (PH), left-sided heart failure, and congenital heart disease.¹ Patients with PH have benefited from major advances in medical treatment during the last decade.²

Use of combination therapy targeting selectively the damaged pulmonary vasculature has led to significant improvement in functional status and quality of life. However, PH still remains a life-threatening disease because of RVF development. Persistent elevated afterload inevitably results in progressive impairment of right ventricular (RV) performance and decline of systolic

This study was done in the Laboratory of Surgical Research of Marie Lannelongue Hospital, from Paris Sud University, Le Plessis Robinson, France

[†] Both J.G. and F.H. contributed equally to this study.

* Corresponding author. Tel: +33 4915129184622; Email: julien.guihaire@u-psud.fr or julienguihaire@gmail.com

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2013. For permissions please email: journals.permissions@oup.com

function has been correlated with a lower survival rate in PH patients.³

Evaluation of RV function plays an important role in managing patients with PH. While RV ejection fraction (RVEF) is commonly used as an index of RV function, it is highly load dependent and does not reflect RV contractility.^{4,5} Using echocardiography, RV fractional area change (RVFAC), or tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) are often used as surrogates of RVEF.⁶ In more recent years, several indices of RV function have been proposed to better reflect ventricular contractility, including the RV myocardial performance index (RVMPI) and more recently the acceleration of the myocardium during isovolumic contraction (IVA).^{7–10} Although these indices have been validated in healthy animals (usually porcine models) following manipulation of afterload and contractility, they have not been assessed in models of RV chronic pressure overload.

To better study the RV function in PH, we have developed a novel large animal model of chronic pressure overload. In our model, PH develops over several weeks and is associated with RV enlargement and dysfunction. For this study, we hypothesized that, in a chronic pressure overload state, RVMPI and IVA are markers of ventricular–arterial coupling rather than RV contractility. This may have important clinical implications when analysing RV function in patients with severe PH. Other markers of RV remodelling that have been analysed include RV end-diastolic area index (RVDAI), RVFAC, TAPSE, and the peak systolic tricuspid annular velocity (S).

Methods

Preparation

The study population comprised a total of seventeen 2-month-old Large White piglets. After premedication with ketamine hydrochloride (15 mg/kg intramuscularly), general anaesthesia was induced with propofol 1% and maintained using continuous isoflurane inhalation. Peripheral oxygen saturation and heart rate (HR) were monitored during each surgical procedure. Pancuronium bromide (2 mg intravenously) was administered for muscle relaxation. Mechanical ventilation through endo-tracheal intubation was performed with a rate of 10 per min, a tidal volume of 15–20 mL/kg, and a pulmonary end-expiratory pressure of 5 cm H₂O (Servo 900, Siemens-Elema AB, Solna, Sweden). Inspired oxygen fraction was adjusted to obtain stable peripheral oxygen saturation up to 95% during all procedures.

Experimental design

Piglets were randomly allocated to two groups: PH group ($n = 11$) and Sham-operated controls ($n = 6$). Mean weight was 25.1 ± 5.7 kg at time of study onset. The study complied with 'Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals' developed by the National Institutes of Health and with the 'Principles of Laboratory Animal Care', developed by the National Society for Medical Research. The protocol was approved by the institutional committee on animal welfare. After completion of the study, animals were euthanized at 12 weeks using lethal potassium infusion.

Experimental model of chronic RV pressure overload

A ligation of the left pulmonary artery (PA) was first performed on piglets after opening the pericardium, via a midline sternotomy, using a strength

suture (Surgical Loop, 75 cm, 4 mm, B-Braun, Tuttlingen, Germany). Selective embolization of the right lower lobe arteries was realized 1 week later. A soft tissue adhesive, *n*-butyl-2-cyanoacrylate (Histoacryl[®], B-Braun), was injected to progressively occlude segmental arteries of the right lower lobe. Embolization procedures were weekly repeated for 5 weeks via percutaneous puncture of the right internal jugular vein and selective catheterism of right lower lobe PA (Figure 1). The amount of injected *n*-butyl-2-cyanoacrylate depended on respiratory and circulatory tolerances and did not exceed 1 mL per week.¹¹ Sham animals underwent same surgical approaches with weekly embolization of saline solution for 5 weeks (Figure 1). Pulmonary haemodynamics, RV structural and functional variables were recorded at 6 weeks for each animal. Among PH animals, a subgroup of nine animals was followed for an additional 6 weeks, five of which have undergone a surgical reperfusion of the left lung under general anaesthesia. An 8 mm diameter polytetrafluoroethylene conduit was sutured between the PA trunk and the left PA beyond the former ligation. These animals were followed until 12 weeks to assess whether improvement in ventricular elastance or ventriculo-arterial coupling would be associated with improvement in indices of RV function (Figure 1).

Haemodynamic measurements

An 8-French sheath (Radiofocus Introducer II, Terumo Medical Corporation, USA) was inserted percutaneously into the right internal jugular vein. A single-lumen catheter (5 Fr Radiofocus, Terumo Medical Corporation, USA) was placed in RV cavity thanks to a guide wire (0.035 inches, Radiofocus, Terumo Medical Corporation) and then pushed in the right PA to record mean pulmonary artery pressure (MPAP). This catheter was secondly used to carry out right lower lobe embolization under fluoroscopic guidance. The ventilator was transiently turned off during all repeated measurements. A thermistor-tipped catheter (7F, Edwards LifeSciences, Irvine, CA, USA) was placed into right PA to measure cardiac output (CO) by the thermodilution method. Cardiac index (CI) was calculated as the ratio of CO on body surface area (BSA). Body surface area was calculated following the equation of Kelley et al.¹² for piglets: $BSA \text{ (cm}^2\text{)} = 734 \times \text{weight}^{0.656}$. Total pulmonary resistances (TPR) were expressed in Wood units (WU) and calculated as follows: $TPR = MPAP/CO$.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed at 6 and 12 weeks with a Vivid E9 ultrasound machine (General Electric Medical System, Milwaukee, WI, USA). All images were recorded under general anaesthesia during transient apnoea. Structural and functional measures were analysed on a comprehensive workstation (EchoPAC Dimension'06, General Electric Medical System) by a reader (F.H.) blinded to the invasive haemodynamic measures. All measures were averaged over 5 cycles. Intravariability was repeated on all measurements and intervariability was done on eight measurements (J.G.). Right ventricular end-diastolic and end-systolic areas (RVEDA and RVESA) were measured in the four-chamber view or equivalent five-chamber view in pig (Figure 2). Relative RV area was defined as RVEDA normalized to left ventricular end-diastolic area measured on the same two-dimensional four-chamber view. Right ventricular fractional area change (RVFAC) was defined as the percent area change between end-diastole and end-systole. TAPSE was measured using M-mode as the maximal excursion of the lateral annulus.¹³ RVMPI was measured as previously described as the ratio of sum of isovolumic contraction and relaxation time over ejection time (Figure 2).^{7,9} The time intervals were measured using pulse wave Doppler of the RV outflow tract and continuous wave Doppler of tricuspid regurgitation signal. When the tricuspid

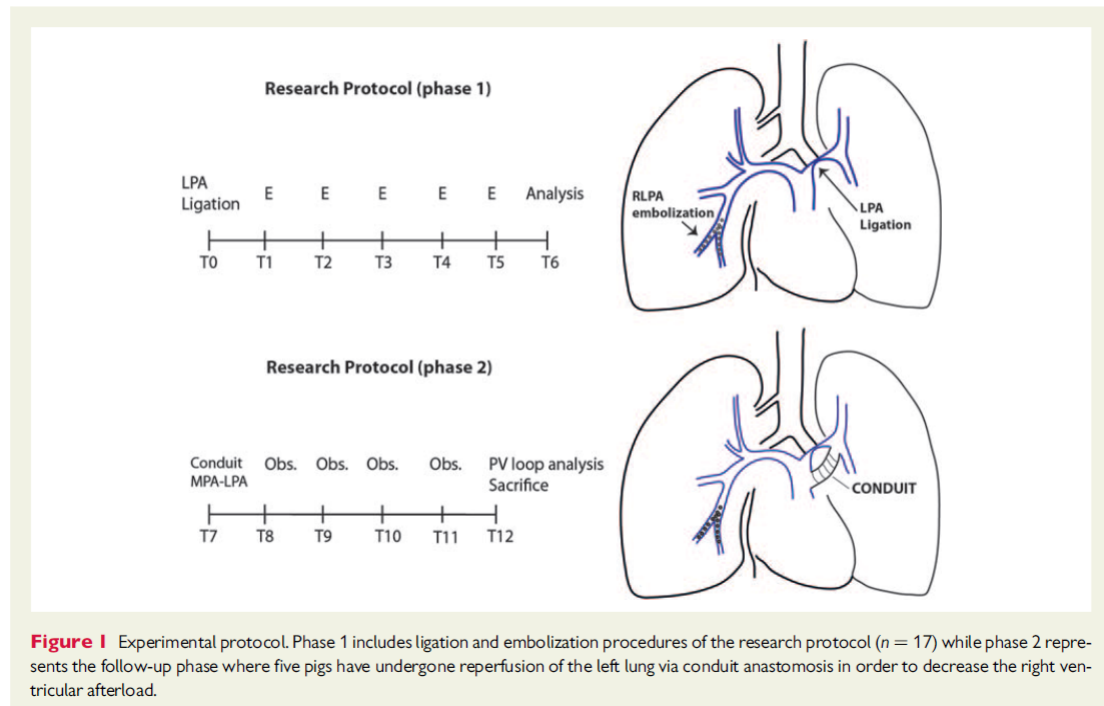


Figure 1 Experimental protocol. Phase 1 includes ligation and embolization procedures of the research protocol ($n = 17$) while phase 2 represents the follow-up phase where five pigs have undergone reperfusion of the left lung via conduit anastomosis in order to decrease the right ventricular afterload.

regurgitation signal did not allow measurements of the regurgitation time, then total time was measured using pulse Doppler of RV inflow signal. Acceleration of the myocardium during isovolumic contraction (IVA) was assessed in the four-chamber view in the proximal segment of RV lateral wall. IVA was measured on isovolumetric curve using post-processing analysis (Figure 2). Pulsed tissue Doppler signals were poor quality in our study and not suitable to analyse the wave during isovolumic contraction.⁸ The same approach was used to measure the peak systolic tricuspid annular velocity (S).

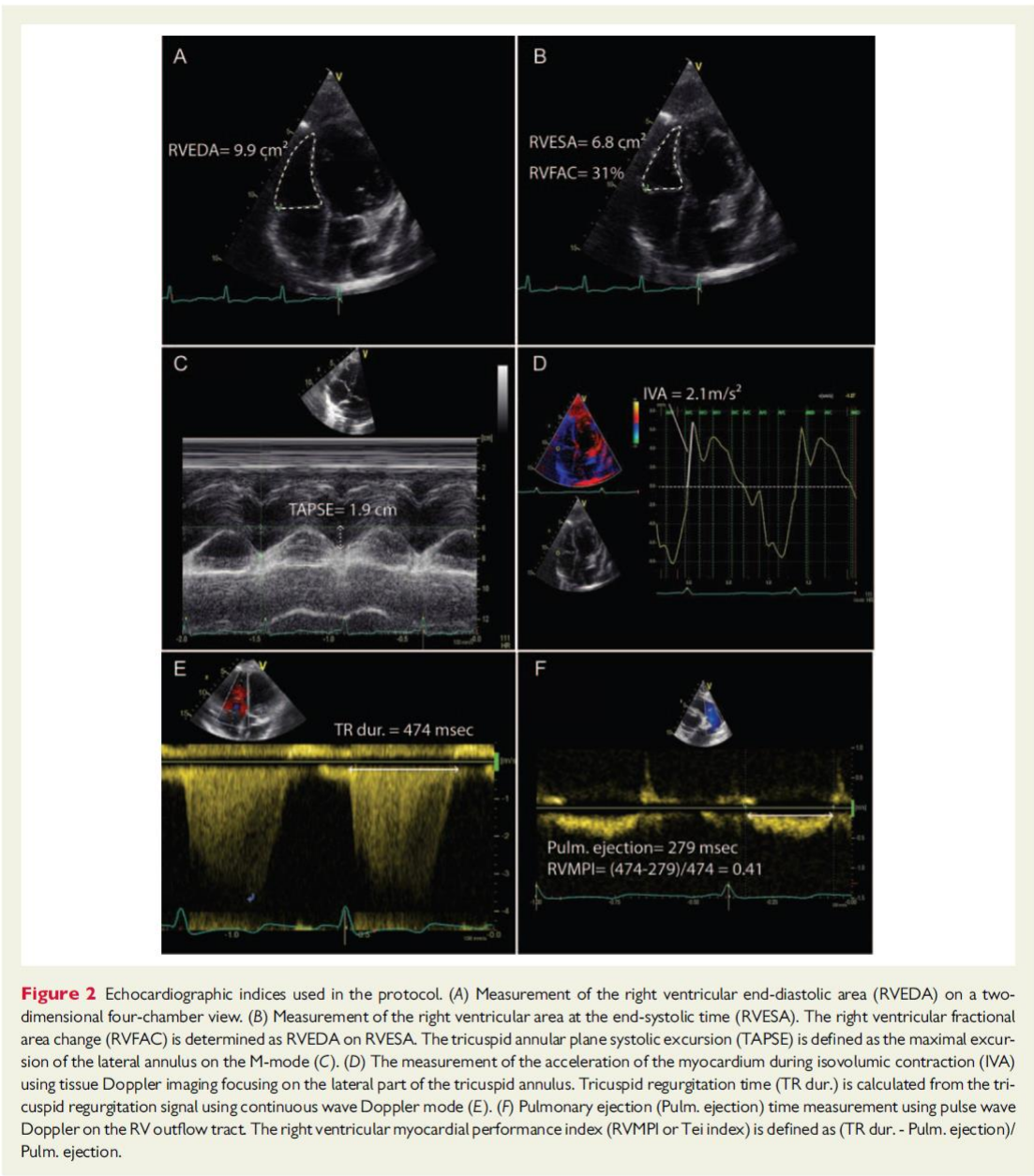
Pressure volume loops assessment and analysis

Right ventricular contractile performance was assessed through conductance technique.¹⁴ A 4-Fr conductance catheter incorporating a micromanometric pressure transducer was inserted in the RV through the right jugular vein after been submerged in saline solution at atmospheric pressure to define the zero pressure as reference. This 12 electrode catheter, with 8 mm sensing intervals, was used to measure immediate volume and pressure (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands). It was connected to a Leycom Sigma-5 signal conditioner processor (CardioDynamics, Leyden, The Netherlands). Instantaneous acquired pressure and volume signals were then processed on dedicated Windows based software (Conduct NT; CD Leycom). Consistency of conductance catheter position was verified by fluoroscopy during all procedures. Calibration of the conductance catheter and assessment of blood resistivity with a 5 mL cuvette connected to a CFL-512 signal conditioner processor (CD Leycom) were realized before baseline recording. A 10 mL injection of 5% hypertonic saline was performed in the superior vena cava to determine parallel conductance (conductance of

surrounding tissues, out of the RV). To obtain volume assessment, the conductance signals were converted to volume signals. The correction factor α was calculated for each measurement comparing stroke volume (SV) obtained by conductance and SV calculated from the ratio of cardiac output (obtained by thermodilution) to HR. An 8-french balloon-tipped catheter was introduced through the right femoral vein via a 10-Fr haemostatic sheath and positioned under fluoroscopic guidance in the inferior vena cava, just below the right atrium (20 mm Large Lumen Occlusion Balloon Catheter, Boston Scientific/Medi-Tech, Watertown, MA, USA). It was inflated to transiently reduce RV inflow and assess end-systolic pressure–volume relationships (ESPVR). The large lumen diameter of the balloon-tipped catheter allowed fast latex balloon deflation. After assessment at rest, dobutamine was intravenously administrated (5 mcg/kg per min during 3 min) and pressure–volume (PV) loops were recorded after a 3 min infusion time. Right ventricular SV was measured through real-time assessment of PV loops, first at rest and then after dobutamine infusion. Stroke volume index (SVI) was calculated as the SV/BSA ratio. End-systolic pressure–volume relationships of the RV could be approximated with a linear relationship. The slope of this linear relation defined RV end-systolic elastance (Ees). Pulmonary arterial elastance (Ea) was calculated as the ratio of RV end-systolic pressure on SV. Right ventricular–pulmonary arterial (RV–PA) coupling was calculated as Ees on the Ea ratio (Ees/Ea).

Statistical analysis

All haemodynamic results are reported as mean $\pm$ standard deviation. Right ventricular structural and functional variables are expressed with mean $\pm$ standard deviation. All data were tested for normality of the distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. One-way analysis of



variance was performed and Fisher's test was used for between-group comparisons. Linear regression approach was used to study the relations between RV structural and functional parameters and RV-PA coupling. Intra-observer variability in echocardiographic measures of RV area and RVFAC will be reported as intra-class correlation coefficient. All statistical analysis was performed using Statview IV software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Results

Animal morbidity related to experimental surgery

Repeated percutaneous punctures of right internal jugular vein did not induce any complication. One animal died from acute RV

failure following the third embolization of the right lower lobe because of a too much increase of pulmonary impedance (MPAP was up to mean systemic artery pressure). This animal was excluded from the study. There was no death from week 6 to week 12 after reperfusion procedure. Dobutamine infusion was not associated to any adverse event.

Haemodynamics

At 6 weeks following sternotomy, there was a significant difference in MPAP (35 ± 9 vs. 14 ± 2 mmHg, $P < 0.01$), TPR (10.3 ± 3.8 vs. 4.4 ± 0.9 WU, $P = 0.006$), and Ea (0.87 ± 0.38 vs. 0.31 ± 0.04 mmHg/mL, $P = 0.003$) between PH animals and controls (Table 1). There was no significant difference in HR (101 ± 18 vs. 101 ± 13 bpm, $P = 0.94$), CI (3.2 ± 1.2 vs. 3.3 ± 0.2 L/min/m², $P = 0.92$), or SVI at rest (43 ± 7 vs. 46 ± 5 mL/m², $P = 0.92$) (Table 1). Stroke volume response to low dose dobutamine (5 mcg/

kg/min) was, however, significantly lower after experimental PH induction (53 ± 7 vs. 64 ± 6 mL/m², $P = 0.01$).

Pressure volume loops analysis at 6 weeks

Table 1 and Figure 3 summarize PV loops characteristics of the study population at 6 weeks. Compared with controls, animals with PH had higher Ees, dP/dt max, and tau, but lower ventricular–arterial coupling (Ees/Ea).

Echocardiographic indices of RV size and function and relationship to RV elastance and RV–PA coupling

Compared with controls, the PH group had significantly higher RV areas (RVEDA and relative RV area) and worst ventricular function as indicated by lower RVFAC, lower TAPSE, and higher RVMPI (Table 1). The IVA and S indexes were also lower on average in the PH group (Table 1). Table 2 and Figures 4 and 5 summarize the regression analysis between the echocardiographic indices of RV size and function and ventricular elastance and ventricular–arterial coupling. There was an inverse relationship between Ees and indices of ventricular function. Increase in Ees correlated with worst ventricular function as suggested by the inverse correlation with RVFAC, TAPSE, and IVA and positive correlation with RVMPI. In contrast, there was a strong direct relationship between ventricular–arterial coupling measured by Ees/Ea and functional indices of RV function (Table 2 and Figure 5).

We used hierarchical models to determine whether right atrial pressure (RAP) or HR improved prediction of functional indices of RV function. The three variables included in the models consisted of ventricular–arterial coupling (Ees/Ea), HR, and RAP. The time constant of isovolumic relaxation (tau) was also included as an independent correlate of the RVMPI. Ees/Ea was chosen in the model instead of Ees because it was a stronger and more physiological relationship with echocardiographic indices than Ees (Table 3). Heart rate did not improve determination of any functional indices in our model, while RAP improved prediction of RVMPI. Tau did not improve prediction of RVMPI.

Dynamic changes in ventricular–arterial coupling and echocardiographic indices

A subgroup of nine pigs was followed up to 20 weeks, five of whom have undergone revascularization using a conduit between main PA and left PA. Improvement in RV–PA coupling was associated with improvement in RV function as indicated by increase in RVFAC, TAPSE, and IVA, and decrease in RVMPI. In contrast, pigs who did not present significant change in ventricular–arterial coupling did not significantly change their indices of RV function.

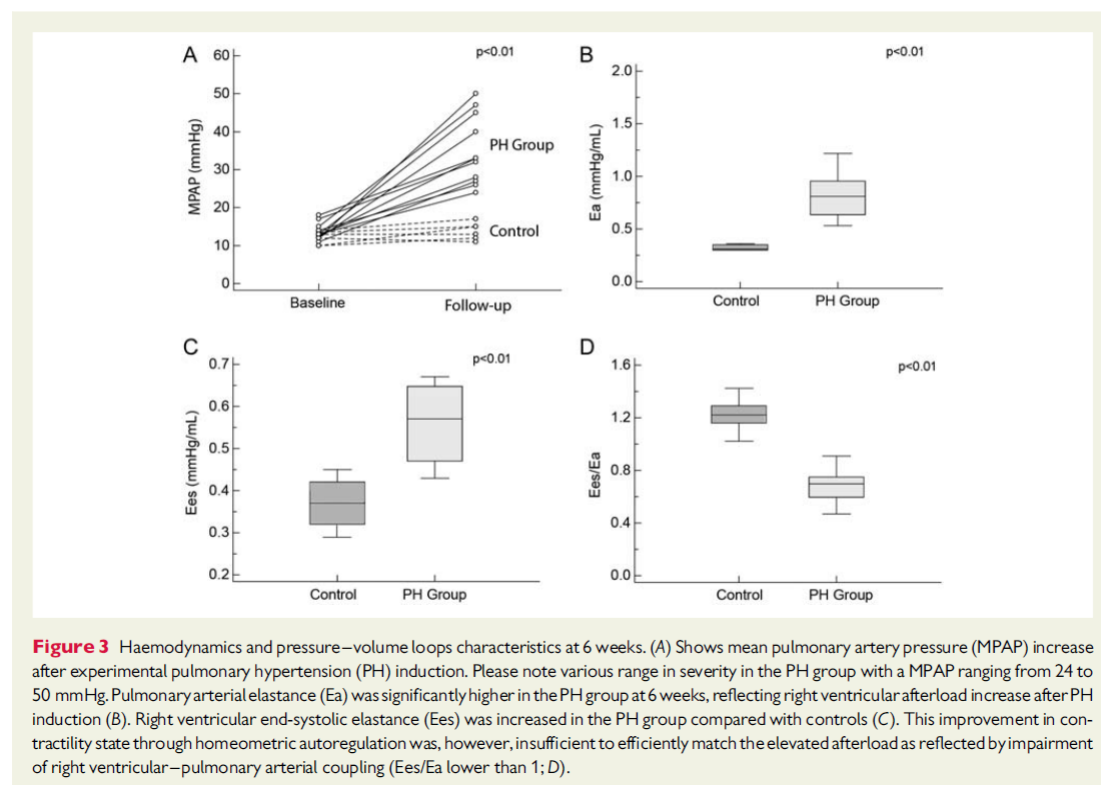
Intra and intervariability in measurements

To determine intra-observer variability, measures were repeated for all pigs at 6 weeks. There was good concordance between measures of RV parameters. For RV end-diastolic area, the average difference in absolute measurement was 0.1 ± 1.4 cm² with a coefficient of correlation of 0.92. For RVFAC, the average difference in absolute measurement was $-1.2 \pm 3.2\%$ with an intra-class correlation coefficient (ICC) of 0.89. For RVMPI, the average difference in absolute

Table 1 Haemodynamic and echocardiographic characteristics of the pulmonary hypertension group and controls at 6 weeks

	PH group (n = 11)	Controls (n = 6)	P-value
Weight (kg)	31 ± 6	31 ± 2	0.77
Haemodynamics			
Heart rate (bpm)	101 ± 18	101 ± 13	0.94
RAP (mmHg)	8 ± 2	5 ± 2	0.007
MPAP (mmHg)	35 ± 9	14 ± 2	<0.01
TPR (WU)	10.3 ± 3.8	4.4 ± 0.9	0.006
Cardiac index (L/min/m ²)	3.2 ± 1.2	3.3 ± 0.2	0.92
Stroke volume index (mL/m ²)	43 ± 7	46 ± 5	0.46
Stroke volume index with dobutamine (mL/m ²)	53 ± 7	64 ± 6	0.01
Pressure–volume loops			
Ea (mmHg/mL)	0.87 ± 0.38	0.31 ± 0.05	0.003
Ees (mmHg/mL)	0.55 ± 0.09	0.38 ± 0.05	<0.001
Ees/Ea	0.67 ± 0.15	1.2 ± 0.16	<0.001
dP/dt max (mmHg/s)	542 ± 152	286 ± 88	0.006
dP/dt min (mmHg/s)	−766 ± 332	−244 ± 65	0.006
tau (ms)	34.7 ± 3.8	18.0 ± 6.8	<0.001
Echocardiography			
RV end-diastolic area index (cm ² /m ²)	11.3 ± 2.6	4.6 ± 0.6	<0.001
Relative RV area (%)	64 ± 21	43 ± 3	0.028
RVFAC (%)	25 ± 5	51 ± 9	<0.001
TAPSE (cm)	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.1	0.002
RVMPI	0.61 ± 0.19	0.30 ± 0.03	0.002
IVA (m/s ²)	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.2	0.003
S (cm/s)	3.8 ± 1.1	5.9 ± 0.9	0.003

Abbreviations are in text.



measurement was 0.0 ± 0.07 with an ICC of 0.95. For IVA, the average difference in absolute measurement was 0.03 ± 0.21 with an ICC of 0.89.

The intervariability in measurements was performed for RVFAC, RVMPI, and IVA. For RVFAC, the average difference in absolute measurement was $-2.1 \pm 5.2\%$ with an ICC of 0.76. For RVMPI, the average difference in absolute measurement was 0.12 ± 0.08 with an ICC of 0.72. For IVA, the average difference in absolute measurement was -0.2 ± 0.18 with an ICC of 0.77.

Discussion

The main finding of our study is that non-invasive indices of RV function are related to ventricular–arterial coupling rather than ventricular elastance. In fact, despite the increase in ventricular elastance observed in our model of chronic pressure overload, all indices of RV function were compatible with worsening function. Compared with prior studies, our study represents the first to validate commonly used indices of RV function in an experimental large animal model of RV remodelling.

Finding an index that reflects ventricular contractility has been an important focus of research in ventricular physiology.^{15–24} Compared with other systolic phase indices such as ejection fraction which are highly dependent on loading conditions, a more specific index of contractility would better reflects the intrinsic ability of the ventricle to improve following medical therapy or after

surgery.^{15–24} Ideally, an index of contractility would be independent of load, sensitive to change in inotropy, independent of heart size and mass, easy and safe to apply and proved to be useful in the clinical setting.²⁵ Currently ventricular elastance determined using PV loops analysis is the gold standard for assessing ventricular contractility.

Clinical studies have shown that while ventricular elastance is increased in PAH, the increase is, however, insufficient to compensate for the increase in afterload and ventricular–arterial uncoupling occurs.^{26–28} With the progressive development of PH, the RV usually dilates and RV systolic dysfunction occurs as reflected by the decrease in RVEF or RVFAC, a two-dimensional surrogate for RVEF. As shown in our model, both RVFAC and TAPSE are not indices of contractility but rather ventricular–arterial coupling. This was supported by the direct association between Ees/Ea and RVFAC as well by the fact that an improvement in ventricular–arterial coupling was related to an improvement in systolic function. The strongest relation between non-invasive indices of RV function and Ees/Ea was observed for the RVAC, supporting evidence for its accuracy to reflect RV function as reported by Caudron *et al.*²⁹ Progressive decrease in RVFAC may further be associated with poor survival in PH patients and increased RVAFC may be a strong predictor of response to vasodilator therapy.^{30,31} In our study, the relationship between TAPSE and ventricular–arterial coupling was only moderate in part due to the fact that following pericardial opening, annular motion may not reflect as well global RV function.³²

Table 2 Correlation between non-invasive systolic phase indices, right ventricular ventricular elastance (Ees), and ventricular-arterial coupling (Ees/Ea) in a model of chronic pressure overload

Non-invasive index of the RV	Ees, r	Ees/Ea, r
Right heart size		
RVDAI	0.75 [#]	-0.80 [#]
RVESAI	0.69 [*]	-0.78 [#]
RV function		
RVFAC	-0.59	0.92 [#]
TAPSE	-0.51 [*]	0.69 [*]
RVMPI	0.68 [*]	-0.79 [#]
IVA	-0.61 [*]	0.86 [#]
S	0.28	0.812 [#]
SV rest	-0.20	0.37
SV dobutamine 5	-0.57 [*]	0.76 [*]
RAP	0.67 [*]	-0.61 [*]

Non-invasive indices of RV function correlated much more strongly with ventricular-arterial coupling than with ventricular elastance where no significant relationship were noted with the exception of RVMPI.

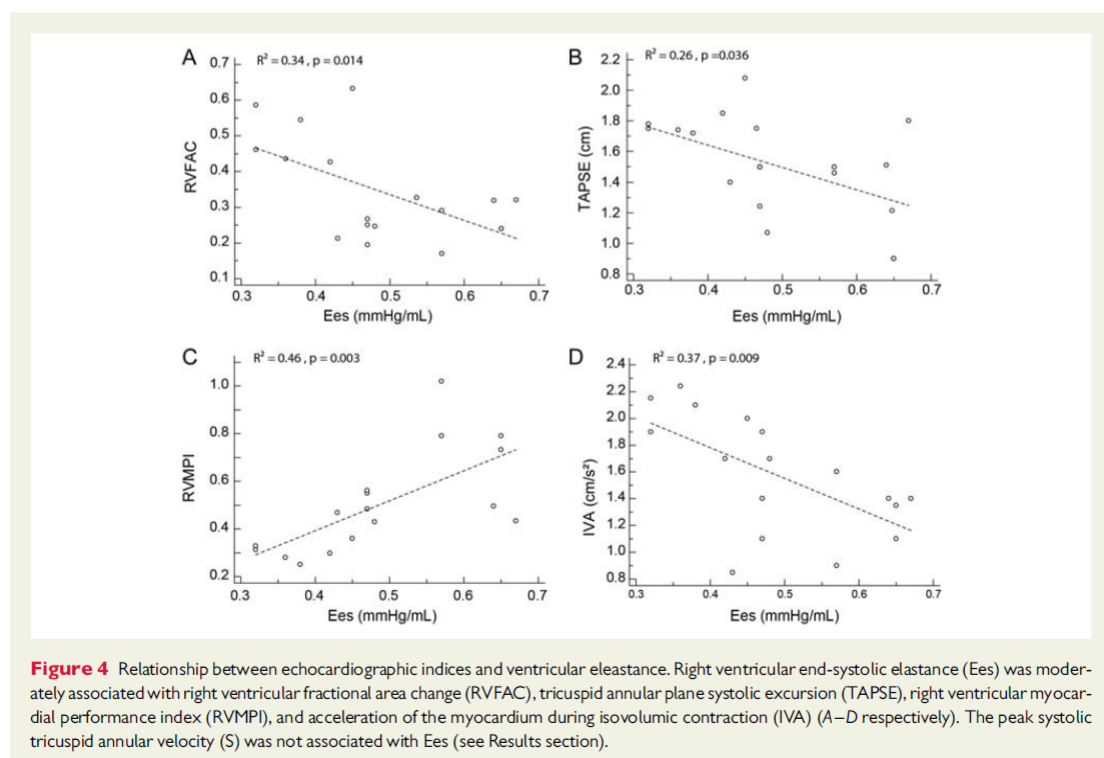
Other abbreviations are in text.

* $P < 0.05$.

$P < 0.001$.

Right ventricular myocardial performance index represents a commonly used time-based index of both systolic and diastolic right heart function.⁷ In our model, RVMPI also increased (worse function) with the degree of RV-PA uncoupling as well as RAP, suggesting that it may well reflect both systolic and diastolic properties of the RV. Our findings on RVMPI are consistent with the previous study of Cheung *et al.*^{8,10} who have demonstrated that although RVMPI decreased (improved functional parameter) with dobutamine infusion, it was also very sensitive to a change in preload or afterload.

Previous studies in the literature investigated simple non-invasive markers of RV contractility, the most promising being IVA.⁸ In their experimental study, Vogel *et al.*⁸ have investigated the value of IVA in healthy pigs after manipulation of loading conditions and contractility with beta-blockade and dobutamine. They have shown that IVA did not change significantly with changes in preload and following acute increase in PA pressure with balloon inflation. IVA did, however, increase with dobutamine infusion as did RV elastance and decreased with esmolol infusion. In contrast to the study by Vogel *et al.*,⁸ we have analysed the correlates of IVA in a model of chronic PH and maladaptive RV remodelling. We found that although ventricular elastance increased with the development of pulmonary vascular disease, IVA decreased in association with the decrease in ventricular-arterial coupling. We also found a weaker relationship between the peak systolic tricuspid annular velocity and RV elastance compared with the relationship between IVA and Ees. Myocardial



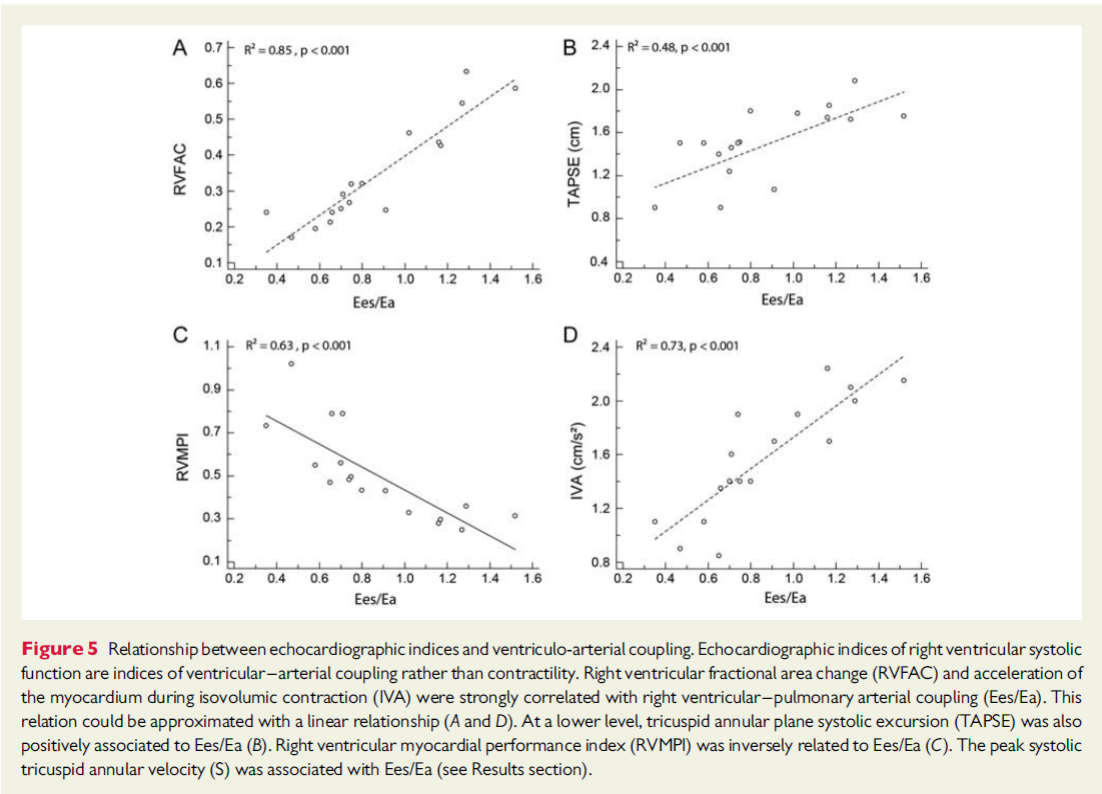


Table 3 Independent correlates of non-invasive indices of RV function and contractility in a model of chronic pressure overload				
Non-invasive index of RV function	Covariants	Variables retained	R ²	P-value
RVFAC	Heart rate; Ees/Ea, RAP	Ees/Ea	0.85	<0.001
TAPSE	Heart rate; Ees/Ea, RAP	Ees/Ea	0.47	0.017
RVMPI	Heart rate; Ees/Ea, RAP, tau	Ees/Ea RAP	0.69	<0.001
IVA	Heart rate; Ees/Ea, RAP	Ees/Ea	0.73	<0.001
S	Heart rate; Ees/Ea, RAP	Ees/Ea	0.81	<0.001

There was no significant relationship between non-invasive indices of RV function and elastance corrected for wall thickness or wall thickness to diameter ratio (surrogate for the mass to volume ratio).
Abbreviations are in text.

velocities during ejection phase are known to change in a way similar to IVA in response to PH but may be more affected by loading conditions.⁸ Changes in contractility during isovolumic contraction can also be reflected by dP/dt max. The peak positive dP/dt max was significantly higher in PH animals at 6 weeks in accordance with Gleason and Braunwald³³ who demonstrated a linear relationship between PA pressure and peak positive dP/dt max. The time spent in isovolumic contraction also interferes on the value of dP/dt max.²³ The acceleration during isovolumic contraction (IVA) has been considered

suitable surrogate of dP/dt max; however, the peak IVA occurs earlier and IVA is more robust in term of load sensitivity compared with dP/dt max.^{14,23} Our results suggest a weak relationship between IVA and dP/dt max in the setting of chronic pressure overload.

The main clinical implication of our study is that non-invasive indices of RV function in PH depend more on ventricular–arterial coupling than on ventricular elastance. Moreover, although ventricular contractility may theoretically be a better marker of recovery than RVEF in patients with chronic PH, current non-invasive markers of

contractility do not appear to be specific for ventricular contractility. In order to improve the management of PH patients, it is necessary to better assess RV pump function. If preload and afterload as well as heart rhythm can be easily measured, the best way to investigate the contractile performance of the RV is still a matter of debate. Our study is the first to show the accuracy of simple non-invasive indices to estimate the dynamic changes of RV–PA coupling in a large animal model of PH. The prognostic relevance of these findings needs to be validated by clinical studies.

Our study has several limitations. First, we used an ‘obstructive’ model of PH and not a validated model of pulmonary arterial hypertension but probably more closed to chronic thromboembolic PH. However, we sought to study RV adaptation to chronic pressure overload whatever the aetiology of PH. Second, although conductance catheterization remains the gold standard by which pressure–volume loops of the RV are performed, this techniques remain challenging due to the shape of the right ventricle and the difficulty in including the infundibulum in RV volumetric estimations. To increase the accuracy of pressure–volume loop measurements, we used a large animal model. Third, it is not known to which extent opening the pericardium could have influence IVA and other non-invasive indices of RV function. We have, however, opened the pericardium in both the SHAM and the PH groups. Fourth, we did not measure ventricular mass or mass–volume ratio using magnetic resonance imaging. This would have allowed us to adjust ventricular elastance measures for mass or mass to volume ratio. Fifth, since cardiac output was not significantly decreased after induction of experimental PH, our model is rather a compensated model of RV dysfunction than a model of maladaptive RV remodelling. Finally in our model, we did not study the effects of changing the loading conditions on indices of RV function. This could have provided further support for the association between indices of RV function and ventricular–arterial coupling.

Indices of RV function are associated with ventricular–arterial coupling rather than with contractility in a model of progressive pressure overload. This may have important clinical implications in using non-invasive indices of RV function in patients with chronic pressure overload.

Acknowledgements

The authors thank the team of the Laboratory of Surgical Research from Marie Lannelongue Hospital for technical assistance and animal healthcare. This study was supported by the ‘Association chirurgicale pour le développement et l’amélioration des techniques de dépistage et de traitement des maladies cardio-vasculaires’ (ADETEC, Suresnes, France) and by Stanford Cardiovascular Institute (Palo Alto, CA, USA). The Vivid E9 cardiac ultrasound system (General Electric Medical System) was financed by a grant from ‘Cardio-vasculaire-Obésité Domaine D’Intérêt Majeur’ (CODDIM cod100158, Région Ile-de-France, France).

Conflict of interest: none declared.

References

- Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* 2008;**117**:1717–31.
- Humbert M. Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev* 2010;**19**:59–63.
- Ernande L, Cottin V, Leroux PY, Girerd N, Huez S, Mulliez A et al. Right isovolumic contraction velocity predicts survival in pulmonary hypertension. *J Am Soc Echocardiogr* 2012;**26**:297–306.
- Chesler NC, Roldan A, Vanderpool RR, Naeije R. How to measure pulmonary vascular and right ventricular function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009;**2009**:177–80.
- Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN, Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation* 2008;**117**:1436–48.
- Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;**23**:685–713; quiz 786–688.
- Tei C, Dujardin KS, Hodge DO, Bailey KR, McGoon MD, Tajik AJ et al. Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr* 1996;**9**:838–47.
- Vogel M, Schmidt MR, Kristiansen SB, Cheung M, White PA, Sorensen K et al. Validation of myocardial acceleration during isovolumic contraction as a novel non-invasive index of right ventricular contractility: comparison with ventricular pressure-volume relations in an animal model. *Circulation* 2002;**105**:1693–9.
- Yeo TC, Dujardin KS, Tei C, Mahoney DW, McGoon MD, Seward JB. Value of a Doppler-derived index combining systolic and diastolic time intervals in predicting outcome in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1998;**81**:1157–61.
- Cheung MM, Smallhorn JF, Redington AN, Vogel M. The effects of changes in loading conditions and modulation of inotropic state on the myocardial performance index: comparison with conductance catheter measurements. *Eur Heart J* 2004;**25**:2238–42.
- Mercier O, Tivane A, Raoux F, Decante B, Eddahibi S, Dartevielle PG et al. Reliable piglet model of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**183**:A2415.
- Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM, Anderson CR. Body surface area of female swine. *J Anim Sci* 1973;**36**:927–30.
- Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemmes AR, Borlaug BA et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *American J Respir Crit Care Med* 2006;**174**:1034–41.
- Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, Burkhoff D. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;**29**:820–6.
- Reuben SR, Butler J, Lee GJ. Pulmonary arterial compliance in health and disease. *Br Heart J* 1971;**33**:147.
- Suga H, Sagawa K, Shoukas AA. Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio. *Circ Res* 1973;**32**:314–22.
- Maughan WL, Shoukas AA, Sagawa K, Weisfeldt ML. Instantaneous pressure-volume relationship of the canine right ventricle. *Circ Res* 1979;**44**:309–15.
- Sagawa K. The end-systolic pressure-volume relation of the ventricle: definition, modifications and clinical use. *Circulation* 1981;**63**:1223–7.
- Starling MR, Walsh RA, Dell'Italia LJ, Mancini GB, Lasher JC, Lancaster JL. The relationship of various measures of end-systole to left ventricular maximum time-varying elastance in man. *Circulation* 1987;**76**:32–43.
- Dell'Italia LJ, Walsh RA. Application of a time varying elastance model to right ventricular performance in man. *Cardiovasc Res* 1988;**22**:864–74.
- Kass DA, Kelly RP. Ventriculo-arterial coupling: concepts, assumptions, and applications. *Ann Biomed Eng* 1992;**20**:41–62.
- Kass DA, Maughan WL. From ‘Emax’ to pressure-volume relations: a broader view. *Circulation* 1988;**77**:1203–12.
- Dell'Italia LJ. The right ventricle: anatomy, physiology, and clinical importance. *Curr Probl Cardiol* 1991;**16**:653–720.
- Kussmaul WG, Noordergraaf A, Laskey WK. Right ventricular-pulmonary arterial interactions. *Ann Biomed Eng* 1992;**20**:63–80.
- Carabello BA. Evolution of the study of left ventricular function: everything old is new again. *Circulation* 2002;**105**:2701–3.
- Champion HC, Michelakis ED, Hassoun PM. Comprehensive invasive and non-invasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation* 2009;**120**:992–1007.
- Kuehne T, Yilmaz S, Steendijk P, Moore P, Groenink M, Saeed M et al. Magnetic resonance imaging analysis of right ventricular pressure-volume loops: in vivo validation and clinical application in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;**110**:2010–6.

28. Wauthy P, Pagnamenta A, Vassalli F, Naeije R, Brimiouille S. Right ventricular adaptation to pulmonary hypertension: an interspecies comparison. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**286**:H1441–7.
29. Caudron J, Fares J, Vivier PH, Lefebvre V, Petitjean C, Dacher JN. Diagnostic accuracy and variability of three semi-quantitative methods for assessing right ventricular systolic function from cardiac MRI in patients with acquired heart disease. *Eur Radiol* 2011;**21**:2111–20.
30. Mauritz GJ, Kind T, Marcus JT, Bogaard HJ, van de Veerdonk M, Postmus PE et al. Progressive changes in right ventricular geometric shortening and long-term survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012;**141**:935–43.
31. Giusca S, Jurcut R, Coman IM, Ghiorgiu I, Catrina D, Popescu BA et al. Right ventricular function predicts clinical response to specific vasodilator therapy in patients with pulmonary hypertension. *Echocardiography* 2013;**30**: 17–26.
32. Tamborini G, Muratori M, Brusoni D, Celeste F, Maffessanti F, Caiani EG et al. Is right ventricular systolic function reduced after cardiac surgery? A two- and three-dimensional echocardiographic study. *Eur J Echocardiogr* 2009;**10**: 630–4.
33. Gleason WL, Braunwald E. Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J Clin Invest* 1962;**42**:80–91.

3. DEUXIEME ETUDE

Soumission à l'European Respiratory Journal le 01/05/2014

(Manuscript ERJ-00813-2014: Major Revision decision on May 17th 2014):

Réserve ventriculaire droite dans un modèle porcin d'hypertension pulmonaire chronique

Right ventricular reserve in a piglet model of chronic pulmonary hypertension

Julien Guihaire, François Haddad, David Boulate, Pierre-Emmanuel Noly, Benoît Decante,

Philippe Darteville, Marc Humbert, Jean-Philippe Verhoye, Olaf Mercier, Elie Fadel

Communication orale:

Définition et corrélats fonctionnels de la réserve ventriculaire droite dans un modèle d'hypertension pulmonaire post-embolique chronique

Definition and functional correlates of right ventricular reserve in a model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

Julien Guihaire, François Haddad, Olaf Mercier, David Boulate, Benoît Decante,

Erwan Flécher, Philippe Darteville, Elie Fadel

International Society for Heart and Lung Transplantation, 32th Annual Meeting and Scientific Sessions

Prague, République Tchèque, 20 Avril 2012

Journal Heart Lung Transplant. 2012;31(4):S61-S62 (abstract)

Etude expérimentale réalisée dans le *Laboratoire de Recherche Expérimentale* (Pr Fadel)

Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Inserm U999, Université Paris Sud.

Objectifs:

La réserve ventriculaire définit l'amplitude de la réponse fonctionnelle à l'exercice ou à une stimulation pharmacologique. La majorité des études sur la fonction ventriculaire droite dans l'HTP chronique rapportent des résultats au repos. Or la réserve ventriculaire pourrait permettre de mieux apprécier la sévérité de l'atteinte cardio-pulmonaire dans cette maladie. Elle peut être exprimée en termes de différence fonctionnelle normalisée par la valeur de repos. La réserve contractile renvoie plus spécifiquement aux variations de la fonction systolique. Le meilleur indice de réserve contractile reste à définir. Par ailleurs les déterminants de la réponse du VD à l'exercice ou à un stress pharmacologique restent méconnus dans l'HTP.

Dans cette étude à partir de notre modèle d'hypertension pulmonaire post-embolique chez le porc, nous avons analysé la relation entre les indices de réserve fonctionnelle du VD et le couplage ventriculo-artériel. Une étude hémodynamique par la technique de conductance a été effectuée, de même que l'analyse morphologique et fonctionnelle du VD par échocardiographie. Les paramètres hémodynamiques étaient mesurés avant puis 3 minutes après l'infusion de dobutamine à la dose de $5 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-2}$. Différentes mesures de la réserve ventriculaire pour quantifier les variations relatives de la fonction systolique étaient rapportées, telles que les variations de volume d'éjection systolique indexé, les variations du dP/dt max et de Ees.

Résultats:

1. Résultats hémodynamiques

A 6 semaines, les animaux du groupe HYPPE présentait une PAP moyenne et des résistances pulmonaires totales plus élevées que le groupe contrôle (respectivement 34 ± 9 vs. 14 ± 2 mm Hg, $P < 0,01$; et 993 ± 572 vs. 349 ± 61 dynes.s.cm⁻⁵, $P < 0,01$). En revanche il n'y avait pas de différence entre les groupes pour l'index cardiaque et le stroke volume indexé. Malgré une augmentation de Ees, le groupe HYPPE présentait une altération du couplage VD/AP ($P < 0,01$). Le remodelage dilaté des cavités droites était associé à une dysfonction systolique du VD chez les animaux soumis à une surcharge chronique de pression caractérisée par une diminution du TAPSE et du RVFAC.

2. Réserve contractile du ventricule droit

Au repos les indices de réserve contractile du VD, incluant le dP/dt max et Ees, étaient plus élevés dans le groupe HYPPE. Le couplage ventriculo-artériel était néanmoins inadapté chez ces animaux puisque l'augmentation de Ees était insuffisante pour compenser l'élévation de l'impédance pulmonaire. Le stress pharmacologique à la dobutamine résultait en une augmentation des paramètres hémodynamiques y compris chez les animaux soumis à une surcharge chronique de pression dans le VD. De même, la perfusion de dobutamine entraînait une amélioration significative des indices de contractilité tels que Ees ($0,53 \pm 0,08$ vs. $0,70 \pm 0,12$ mm Hg, $P < 0,01$) et dP/dt max (540 ± 141 vs. 1079 ± 353 mm Hg.s⁻¹, $P < 0,01$) comparés aux valeurs de repos. Le découplage VD/AP ne se corrigeait cependant pas sous dobutamine dans le groupe HYPPE ($0,66 \pm 0,18$ vs. $0,55 \pm 0,21$, $P < 0,14$) tandis qu'il était amélioré dans le groupe contrôle ($1,23 \pm 0,17$ vs. $2,14 \pm 0,55$, $P = 0,01$).

3. Relation entre les indices de réserve contractile du ventricule droit et le couplage ventriculo-artériel

Plus le couplage entre le VD et la circulation pulmonaire était altéré, et plus la réponse à la dobutamine du stroke volume indexé était faible. De même, le découplage ventriculo-artériel s'associait à de plus faibles variations de dP/dt max et stroke volume indexé après stimulation à la dobutamine. L'indice de couplage au repos était plus fortement associé aux variations du stroke volume indexé ($R^2 = 0,74$, $P < 0,01$) et du dP/dt max ($R^2 = 0,70$, $P < 0,01$) qu'aux variations de Ees ($R^2 = 0,36$, $P < 0,01$).

Limites:

Dans cette étude expérimentale, nous avons utilisé un modèle de remodelage ventriculaire droit à péricarde ouvert. Or nous savons que le péricarde joue un rôle majeur dans l'interdépendance biventriculaire. Son ouverture prévient la trop forte diminution du débit cardiaque en réponse à une surcharge chronique de pression dans le VD. Il s'agit donc davantage d'un modèle de remodelage compensé que de défaillance ventriculaire droite. Par ailleurs, nous n'avons pas utilisé l'IRM cardiaque comme méthode de mesure des volumes ventriculaires, mais une estimation par la

technique de conductance intraventriculaire.

Conclusion:

Nous rapportons pour la première fois une relation forte entre le couplage ventriculo-artériel et la réserve contractile du VD. Les résultats de cette étude sur l'animal ont deux principales implications cliniques potentielles. Tout d'abord pour l'évaluation fonctionnelle des patients souffrant d'HTP puisque nous montrons que la mesure de la réserve contractile du VD peut permettre d'estimer le degré de couplage ventriculo-artériel sans autre investigation invasive. Nous montrons également sur un modèle animal d'HTP chronique compensé que de faibles doses de dobutamine ne permettent pas d'augmenter le stroke volume indexé et que l'optimisation du débit cardiaque par stimulation pharmacologique se fait essentiellement par réponse chronotrope dans les conditions de surcharge chronique de pression.



RIGHT VENTRICULAR RESERVE IN A PIGLET MODEL OF CHRONIC PULMONARY HYPERTENSION

Journal:	<i>European Respiratory Journal</i>
Manuscript ID:	ERJ-00813-2014
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	01-May-2014
Complete List of Authors:	Guihaire, Julien; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Haddad, Francois; Stanford University, Medicine Boulate, David; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Noly, Pierre Emmanuel; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Decante, Benoît; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Dartevelle, Philippe; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Humbert, Marc; Université Paris-Sud, Service de Pneumologie, Hôpital Bicêtre, APHP Verhoye, Jean Philippe; Pontchaillou Hospital, Thoracic and Cardiovascular Surgery Mercier, Olaf; Marie Lannelongue hospital, Thoracic Surgery; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research Fadel, Elie; Université Paris Sud, Surgery; Marie Lannelongue Hospital, Laboratory of Surgical Research
Key Words:	experimental surgery, exercise testing, pulmonary circulation, right ventricular overload

SCHOLARONE™
Manuscripts

Title: RIGHT VENTRICULAR RESERVE IN A PIGLET MODEL OF CHRONIC PULMONARY HYPERTENSION

Summary: Decreased right ventricular reserve was associated with impaired ventricular-arterial coupling in pulmonary hypertension

Authors: Julien Guihaire, MD¹, François Haddad, MD², David Boulate, MD¹, Pierre-Emmanuel Noly, MD¹, Benoit Decante, MSc¹, Philippe Darteville, MD¹, Marc Humbert, MD, PhD⁴, Jean-Philippe Verhoye, MD, PhD³, Olaf Mercier, MD, PhD¹, Elie Fadel, MD, PhD¹.

Affiliations:

1) Laboratory of Surgical Research and INSERM U999, University of Paris-Sud, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France

2) Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University, Palo Alto, California, USA

3) Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital of Rennes, Rennes, France

4) University of Paris-Sud, Faculté de médecine, Kremlin-Bicêtre, AP-HP, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, INSERM U999, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson, France

Address for correspondence : Julien Guihaire, Laboratory of Surgical Research and Inserm U999, University of Paris-Sud, Marie Lannelongue Hospital, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson, France ; tel: +33140942800; fax: +33146303792; e-mail: julien.guihaire@u-psud.fr

This study was performed in the Laboratory of Surgical Research of Marie Lannelongue Hospital, University of Paris-Sud, Le Plessis Robinson, France.

Word count: 2934

ABSTRACT

Question: Right ventricular (RV) response to exercise or pharmacological stress is not well documented in pulmonary hypertension. We investigated the relationship between RV reserve and ventricular-arterial coupling.

Materials: Surgical ligation of the left pulmonary artery was performed in 13 Large White piglets (PH group), thereafter weekly combined to embolization of the right lower lobe for 5 weeks. A control group of 6 piglets underwent sham procedures. Right heart catheterization and echocardiography were performed at week 6. Pressure-volume loops were recorded before and after dobutamine infusion.

Results: Induction of experimental PH resulted in a higher mean pulmonary artery pressure (34 ± 9 vs. 14 ± 2 mm Hg, $P < 0.01$) and in a lower ventricular-arterial coupling efficiency (0.66 ± 0.18 vs. 1.24 ± 0.17 , $P < 0.01$) compared to controls at 6 weeks. Relative changes of RV stroke volume index and end-systolic elastance were lower in the PH group (respectively $47\% \pm 5\%$ vs. $20\% \pm 5\%$, $P < 0.01$; and $81\% \pm 37\%$ vs. $32\% \pm 14\%$, $P < 0.01$). Change in SVI was strongly associated with resting ventricular-arterial coupling ($R^2 = 0.74$, $P < 0.01$).

Answer: RV reserve was associated with ventricular-arterial coupling in a porcine model of chronic pressure overload.

Key words: right ventricle; pulmonary hypertension; animal model; ventricular-arterial coupling; exercise stress testing.

ABBREVIATIONS LIST**CI:** cardiac index**Ees:** end-systolic elastance**Ea:** arterial elastance**Eed:** diastolic elastance**PA:** pulmonary artery**PH:** pulmonary hypertension**PAH:** pulmonary arterial hypertension**PV:** pressure-volume**RV:** right ventricular**MPAP:** mean pulmonary artery pressure**RVFAC:** right ventricular fractional area change**SVI:** stroke volume index**TPR:** total pulmonary resistance**TAPSE:** tricuspid annular plane systolic excursion

INTRODUCTION

Survival in patients with pulmonary hypertension (PH) is closely related to right ventricular (RV) function.¹⁻³ In hemodynamic based studies, low cardiac index and increased right atrial pressure at rest are strong predictors of outcome. While the majority of studies have focused on evaluating RV function at rest, there has been in recent years a renewed interest in evaluating the dynamic response of the right ventricle to either exercise or pharmacological stimulation.^{4,5} Noontens et al. were to describe the significant decrease in contractile reserve in patients with PH.⁶ In their study, RVEF failed to increase and actually decreased with exercise in the majority of patients with moderate to severe pulmonary vascular disease.

At this time, the physiological correlates of RV response to exercise or pharmacological stress (RV reserve) are not well known in pulmonary hypertension (PH). For this study, we hypothesize that RV reserve to dobutamine would be closely associated with ventricular-arterial coupling. Ventricular-arterial coupling describes the relationship between RV contractility and afterload and is measured using the ratio of ventricular elastance to arterial elastance (E_{es}/E_a). We further hypothesized that dobutamine can improve RV end-diastolic pressure independently of the altered coupling at baseline. Finally, we hypothesized that tissue expression of BNP would also be closely associated with RV contractile reserve. A better understanding of RV response to dobutamine can also bring some insights on understanding ventricular response of patients presenting acute RV failure syndrome. For this study, we developed a large animal model of progressive pressure overload with a good distribution of RV function at baseline.

METHODS

Experimental model of chronic pulmonary hypertension

Protocol for animals anaesthesia is mentioned in the online supplementary material. Thirteen two-month old Large White piglets underwent a ligation of the left pulmonary artery (PA) through midline sternotomy (PH group). Afterwards selective pulmonary embolizations were repeated once a week for 5 weeks using a soft tissue adhesive, n-butyl-2-cyanoacrylate (Histoacryl®, B-Braun, Tuttlingen, Germany), to progressively occlude the segmental arteries of the right lower lobe. As previously reported, animals developed PH associated with RV remodelling and dysfunction after 5 weeks.⁷ Sham surgical procedures were performed in 6 other piglets (Sham group). At week 6, PH animals were randomly allocated to either a surgical reperfusion of the left lung using a short bypass between the PA trunk and the left PA (REPERFUSION group, n=6), or no treatment (HYPPE group, n=7). The research protocol was approved by the Institutional Committee on Animal Welfare. All animals received humane care in compliance with the 'Principles of Laboratory Animal Care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996).

Right heart catheterization

Pulmonary hemodynamics including heart rate, right atrial pressure (RAP), mean pulmonary artery pressure (MPAP) and cardiac output (CO) were derived by thermodilution under general anaesthesia at week 6 in all animals using a 7-Fr catheter (Edwards LifeSciences, Irvine, CA, USA). Total pulmonary resistance (TPR) was expressed in $\text{dynes}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-5}$ and calculated as follows: $\text{TPR} = [(\text{MPAP}) \times 80] / \text{CO}$. Cardiac output was indexed to the body surface area (BSA) to define cardiac index (CI) following the equation of Kelley et al. for piglets: $\text{BSA} (\text{cm}^2) = 734 \times \text{weight}^{0.656}$.⁸ Cardiac power index was calculated as follows: $\text{MPAP} \times \text{CI}$.

Conductance measurements

Synchronous pressure and volume signals were recorded at weeks 6 and 12 using a 4-Fr conductance-catheter (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands) inserted in the right ventricle as previously reported.^{7, 9} Conductance measurements are detailed in the online supplemental materials. Operant end-diastolic elastance (Eed) was defined by the changes in diastolic pressure associated with a change in end-diastolic volume. End-systolic elastance of the right ventricle (Ees) was defined by the slope of the end-systolic PV relationship. Pulmonary arterial elastance (Ea) was calculated as the ratio of RV end-systolic pressure on SV. The Ees/Ea ratio determined the efficiency of right ventricular-pulmonary arterial (RV-PA) coupling. Measurements (heart rate, SV, dP/dt max, Ees) were repeated after 3 minutes of low-dose dobutamine infusion ($5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-2}$). Different metrics of RV contractile reserve were reported, reflecting relative changes in indices of systolic function: (SVI after stress – SVI at rest)/SVI at rest; (dP/dt max after stress – dP/dt max at rest)/dP/dt max at rest; (Ees after stress – Ees at rest)/Ees at rest. We also defined three categories regarding the degree of RV-PA coupling: mild ($\text{Ees/Ea} < 0.7$), moderate ($0.7 < \text{Ees/Ea} < 1$) and normal (Ees/Ea).

Echography of the right ventricle

Echocardiography (Vivid E9, General Electric Medical System, Milwaukee, WI, USA) was performed at week 6 under general anaesthesia for measurements of the maximal transverse end-diastolic diameter of the right ventricle (RVEDD), the RV end-diastolic area indexed to the BSA (RVEDAI), the right ventricular fractional area change (RVFAC), the right ventricular myocardial performance index (RVPMI) and the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE).

Reverse transcription polymerase chain reaction assay

1
2
3 Animals were euthanized at week 12 for procurement of the right ventricle. Total RNA was
4 prepared and quantified according to a method we previously described. Reverse
5 transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed for brain natriuretic
6 peptide (BNP) and beta-myosin heavy chain (β -MHC) with pig-specific primers
7 (#Ss03392423_m1 and #Ss03392411_m1, respectively; AppliedBiosystems, Villebon sur
8 Yvette, France). Tissue expression of β -MHC and BNP was normalized to that of 18S gene
9 for each sample.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 Statistical analysis

20 Continuous variables were presented as mean $\pm$ standard deviation. Differences between
21 study groups were detected using one-way analysis of variance (ANOVA). Within groups'
22 changes after pharmacological stimulation were evaluated using paired Student's *t*-tests.
23 Relationships between different modalities of RV contractility assessment and RV-PA
24 coupling or with non-invasive indices of RV function were approached by linear regression.
25 $P < 0.05$ was considered significant. All data were analyzed using Prism statistical software
26 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Hemodynamics and Right Ventricular Remodeling after Induction of Experimental Pulmonary Hypertension

Characteristics of the study groups at week 6 are listed in Table 1.

Table 1. Resting hemodynamics, right ventricular remodelling and function at 6 weeks.

Variables	PH group (n=13)	Sham group (n=6)	P value
Body weight (kg)	31.9 ± 5.6	30.6 ± 2.2	0.59
Mean BP (mm Hg)	63 ± 13	70 ± 11	0.25
Heart rate (beat.min ⁻¹)	100 ± 16	101 ± 13	0.93
<i>Pulmonary catheterism</i>			
RAP (mm Hg)	8 ± 2	5 ± 2	0.01
RVEDP	13 ± 5	5 ± 3	<0.01
Mean PAP (mm Hg)	34 ± 9	14 ± 2	<0.01
CI (L.min ⁻¹ .m ⁻²)	3.2 ± 1.0	3.2 ± 0.2	0.93
TPR (dynes.s.cm ⁻⁵)	993 ± 572	349 ± 61	0.01
Cardiac power index (W.m ⁻²)	108 ± 42	45 ± 6	<0.01
<i>Conductance measurements</i>			
SVI (mL.m ⁻²)	41 ± 7	44 ± 5	0.49
RV stroke work (mm Hg.mL)	1853 ± 851	881 ± 265	0.03
dP/dt max (mm Hg.s ⁻¹)	540 ± 141	306 ± 72	<0.01
dP/dt min (mm Hg.s ⁻¹)	-738 ± 299	-244 ± 65	<0.01
Ees (mmHg.mL ⁻¹)	0.54 ± 0.09	0.37 ± 0.05	<0.01
Ea (mmHg.mL ⁻¹)	0.88 ± 0.35	0.32 ± 0.06	<0.01
Ees/Ea	0.66 ± 0.18	1.24 ± 0.17	<0.01
Eed (mmHg. mL ⁻¹)	0.33 ± 0.13	0.11 ± 0.07	<0.01
Tau (ms)	34 ± 4	18 ± 7	<0.01
<i>Echocardiography</i>			
RVEDD (cm)	2.1 ± 0.6	1.4 ± 0.3	0.02
RVEDAI (cm ² .m ⁻²)	11.0 ± 2.4	4.6 ± 0.6	<0.01
RVFAC	0.25 ± 0.04	0.51 ± 0.08	<0.01
RVMPI	0.62 ± 0.17	0.30 ± 0.04	<0.01
TAPSE (cm)	1.4 ± 0.4	2.0 ± 0.2	<0.01

PH, pulmonary hypertension; BP, blood pressure; RAP, right atrial pressure; RVEDP, right ventricular end-diastolic pressure; PAP, pulmonary artery pressure; CI, cardiac index; TPR, total pulmonary resistance; SVI, stroke volume index; RV, right ventricular; Ees, end-systolic

1
2
3 elastance; Ea, arterial elastance; Eed, operant diastolic elastance; RVEDD, right ventricular
4 end-diastolic diameter; RVEDAI, right ventricular end-diastolic area index; RVFAC, right
5 ventricular fractional area change; RVMPI, right ventricular myocardial performance index;
6 TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion. Values are expressed as mean $\pm$ SD.
7 Statistical significance was set at $P < 0.05$.
8
9

10 Left PA ligation combined with embolization of the segmental arteries of the right lower lobe
11 for 5 weeks resulted in significant changes in pulmonary hemodynamic as illustrated by the
12 higher RAP, MPAP and TPR among PH animals. Heart rate and CI were not different
13 between PH and Sham groups, while cardiac power index and RV stroke work were higher
14 at 6 weeks after induction of experimental PH. Chronic pressure overload was associated
15 with RV enlargement as shown by the higher values of RVEDD and RVEDAI among PH
16 animals. RV systolic dysfunction was moreover observed in PH animals as illustrated by the
17 lower RVFAC and TAPSE compared to controls.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 **Right Ventricular Contractile Reserve**

29
30 At rest, indices of RV contractility, including the maximal rate of rise of RV pressure (dP/dt
31 max) and Ees, were significantly higher in the PH group. Impairment of ventricular-arterial
32 coupling was however observed in this group, since the increased Ees did not compensate
33 for the increasing in Ea. Changes in RV hemodynamics after pharmacological stress at week
34 6 are displayed in the Supplemental Figure 1. Dobutamine infusion ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-2}$) resulted
35 in significant increase in heart rate (101 ± 16 vs. 131 ± 17 bpm, $P < 0.01$), SVI (41.5 ± 6.6 vs.
36 50.1 ± 7.8 mL, $P < 0.01$) and CI (3.2 ± 1.1 vs. 4.7 ± 1.3 L $\cdot\text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, $P < 0.01$) in the PH group.
37 Similarly pharmacological stress was associated with an improvement of RV contractility as
38 measured by Ees (0.53 ± 0.08 vs. 0.70 ± 0.12 mm Hg $\cdot\text{mL}^{-1}$, $P < 0.01$) and higher dP/dt max
39 (540 ± 141 vs. 1079 ± 353 mm Hg $\cdot\text{s}^{-1}$, $P < 0.01$) compared to measurements at rest. This
40 increasing in Ees was however insufficient to improve RV-PA coupling in PH animals ($0.66 \pm$
41 0.18 vs. 0.55 ± 0.21 , $P = 0.14$), while Ees/Ea was higher in Sham animals after dobutamine
42 infusion at week 6 (1.23 ± 0.17 vs. 2.14 ± 0.55 , $P = 0.01$).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Relationships between Indices of Right Ventricular Contractile Reserve and Ventricular-Arterial Coupling

Pharmacological stress resulted in a marked increase in SVI, dP/dt max and Ees in both groups. The relative changes during dobutamine stimulation were however higher in controls compared to PH animals (respectively $47\% \pm 5\%$ vs. $20\% \pm 5\%$, $P<0.01$; $214\% \pm 55\%$ vs. $95\% \pm 51\%$, $P<0.01$; and $81\% \pm 37\%$ vs. $32\% \pm 14\%$, $P<0.01$) (Figure 1).

The lower was Ees/Ea, the lower was SVI in response to dobutamine (Figure 2A). The relationships between indices of contractile reserve and RV-PA coupling at rest (Ees/Ea) were better approximated by linear approach (Figures 2B, C and D). Impairment of RV-PA coupling ($Ees/Ea<1$) was associated with lower changes in SVI and dP/dt max after dobutamine stimulation. Resting Ees/Ea was more strongly associated with relative changes in SVI ($R^2=0.74$, $P<0.01$) and in dP/dt max ($R^2=0.70$, $P<0.01$), than with relative change in Ees ($R^2=0.36$, $P<0.01$).

Diastolic Reserve of the Right Ventricle and Relationships with RV/PA coupling

At rest, diastolic time constant tau, RV end-diastolic pressure (RVEDP) and operant diastolic elastance (Eed) were significantly higher in PH animals (Table 1). We observed that animals with mild to severe RV/PA uncoupling ($Ees/Ea<1$) had lower Eed at rest compared with efficient-coupling animals (Figure 3). With dobutamine stimulation, RVEDP decreased in both groups, but remained significantly higher in the PH group (respectively 12 ± 4 vs. 4 ± 3 mm Hg, $P<0.01$), whereas tau became lower in both groups (respectively 23 ± 7 vs. 17 ± 10 ms, $P=0.23$). Operant RV diastolic elastance (Ed) also remained significantly higher after dobutamine stimulation in PH animals (0.29 ± 0.01 vs. 0.09 ± 0.01 mm Hg.mL⁻¹, $P<0.01$).

Relationship between gene expression and RV reserve

At 12 weeks, PH animals who did not receive any treatment at 6 weeks, shared a higher level of gene expression for BNP and β -MHC compared to the REPERFUSION group (respectively 2.55 ± 1.49 vs. 1.80 ± 1.47 , $P<0.01$; and 1.58 ± 0.43 vs. 1.31 ± 0.27 , $P=0.02$)

(Figure 4, sections A and B). Considering the relationships between gene expression and RV systolic reserve illustrated by SVI after dobutamine stimulation at 12 weeks, we observed a trend for an inverse relationship between BNP expression and RV reserve ($R^2=0.343$, $P=0.05$). The relationship between β -MHC expression and SVI max was best estimated through a linear approach ($R^2=0.65$, $P<0.01$). The strongest relationship between RV gene expression and RV reserve was observed with β -MHC (Figure 4, sections C and D).

DISCUSSION

The main finding of our study is that in pressure overload states, a decrease in RV contractile reserve is strongly associated with impairment in ventricular-arterial coupling. We have also found that RVEDP, operant diastolic elastance and tau improve following low dose of dobutamine infusion. These physiological observations have clinical implication for both screening and management of patients with PH.

Emphasis in PH has recently changed from focusing on either the pulmonary vasculature or the right ventricle to focusing on the cardio-pulmonary unit. Insights from PV loops analysis have demonstrated that a ventricle that adapts well to chronic PH is able to increase its contractility to match the increase in afterload. Ventricular-arterial coupling is the metric of choice to analyse this matching between contractility and afterload. Consistent with previous clinical and experimental studies, we have found that altered ventricular-arterial coupling is common in the presence of chronic pressure overload states of the right ventricle.¹⁰

Our study demonstrates that in the setting of chronic pressure overload state, RV contractile reserve may be a more sensitive marker of ventricular dysfunction. In fact, while SVI and CI were not significantly decreased at rest in the PH group, contractile reserve measured by peak or relative changes in SVI or CI were significantly impaired. The impairment in contractile reserve was also reflected by lower relative increase of more specific indices of contractility such as Ees and dP/dt max in the PH group. To the best of our knowledge, this is the first report of a strong relationship between contractile reserve and resting ventricular-arterial coupling in an experimental model of RV dysfunction. Several studies have previously demonstrated that functional changes during exercise are adaptive if the ventricle is energetically efficient, which is usually observed with an Ees/Ea ratio of 1 to 2. Our findings are in accordance with studies showing that patients with PH have an impairment of power transfer and ventricular efficiency during exercise.^{7, 11}

Although this was not specifically analysed in the study, several mechanisms can contribute to the decreased contractile reserve to dobutamine. First, the decrease in B1-adrenergic receptor density in chronic RV pressure overload could explain in part the decrease in

responsiveness to dobutamine. Second, the decrease in capillary density in the presence of a hypertrophied ventricle could contribute to perfusion abnormalities and inefficient myocardial O₂ utilization leading to impaired contractile reserve.¹²⁻¹⁶ Third, a metabolic shift from fatty acids to glucose oxidation has been further described in the stressed right ventricle.¹⁷⁻¹⁹ In terms of cellular mechanisms, we analysed the BNP and the β -MHC expression. Not surprisingly, BNP expression was inversely associated with RV contractile reserve measured by peak SVI. Combined with significant increase in RVEDD and RVEDAI in PH animals, this result suggests that RV enlargement is strongly associated with impaired response to dobutamine in our large animal model. On the other hand, we show that β -MHC expression was higher in animals with low contractile reserve. Since β -MHC is mainly involved in weak contractions with slow shortening velocity, this mechano-enzyme may not play a major role in RV response to stress.²⁰ We previously reported that β -MHC is up-regulated after 12 weeks in our model of chronic RV pressure overload.²¹ The present findings suggest that impaired RV contractile reserve is associated with increased β -MHC expression in the setting of chronic pressure overload.

In addition to contractile reserve, our study also highlights that dobutamine can improve the diastolic characteristics of the pressure overloaded right ventricle including RVEDP, Ed and relaxation (tau). The increase in contractility shift the Starling curve allowing a lower of equilibrium between venous return and cardiac output.

Clinical implications

The study has two main clinical implications. First, for screening purposes in patients in whom estimation of pulmonary pressures is not possible, evaluation of contractile reserve could help unmask mild ventricular-arterial uncoupling. Second, the study highlights that contractile reserve could be more useful than resting parameters for risk stratification. In a recent study, Blumberg et al. have shown that cardiac index at peak exercise was more strongly associated with outcome than resting parameters.²² Further studies, however, are needed to document the incremental value of contractile reserve to measures of RV strain or

RV remodeling which will require a large sample size. The study also points to the fact for the management of patients with severe RV failure and PAH, low dose dobutamine is unlikely to significantly increase stroke volume and that majority of the increase in cardiac index will be through a chronotropic response. The lusitropic effects of dobutamine could also help improve systemic or renal congestion.

Study limitations

The study has several limitations. First, the pericardium was opened in the model which may decrease the effects of ventricular interdependence.²³ In fact, adverse effects of RV enlargement on left ventricular function have been demonstrated to be significantly lower when the pericardium is open. Second, we did not use cardiac magnetic resonance imaging for more accurate measurement of RV volumes and function. The strength of our study was the ability to perform echocardiography, conductance measurements and exercise stress test in PH animals in two hours, allowing us to analyse the relationships between invasive and non-invasive indices of RV function.

CONCLUSION

We report for the first time a strong relationship between ventricular-arterial coupling and RV contractile reserve in a porcine model of chronic pressure overload. This could have implications not only for screening but also for risk assessment of patients with pulmonary hypertension. Molecular mechanisms underlying the impaired ventricular reserve have to be further investigated in chronic pulmonary hypertension.

Funding sources: This work was supported by the "Association chirurgicale pour le développement et l'amélioration des techniques de dépistage et de traitement des maladies cardio-vasculaires" (ADETEC, Suresnes, France). The Vivid E9 cardiac ultrasound system (General Electric Medical System) was financed by a grant from the "Cardio-vasculaire-Obésité Domaine D'Intérêt Majeur" (CODDIM cod100158, Région Ile-de-France, France).

Conflict of interest: None declared.

REFERENCES

1. Humbert M. Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev*. 2010;19:59-63.
2. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A and Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135:794-804.
3. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, Torbicki A, Voelkel NF and Hassoun PM. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D22-33.
4. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ and Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117:1717-31.
5. Haddad F, Vrtovec B, Ashley EA, Deschamps A, Haddad H and Denault AY. The concept of ventricular reserve in heart failure and pulmonary hypertension: an old metric that brings us one step closer in our quest for prediction. *Current opinion in cardiology*. 2011;26:123-31.
6. Nootens M, Wolfkiel CJ, Chomka EV and Rich S. Understanding right and left ventricular systolic function and interactions at rest and with exercise in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 1995;75:374-7.
7. Guilhaire J, Haddad F, Boulate D, Decante B, Denault AY, Wu J, Herve P, Humbert M, Darteville P, Verhoye JP, Mercier O and Fadel E. Non-invasive indices of right ventricular function are markers of ventricular-arterial coupling rather than ventricular contractility: insights from a porcine model of chronic pressure overload. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2013;14:1140-9.
8. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM and Anderson CR. Body surface area of female swine. *J Anim Sci*. 1973;36:927-30.
9. Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM and Burkhoff D. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res*. 1995;29:820-6.
10. Kussmaul WG, Noordergraaf A and Laskey WK. Right ventricular-pulmonary arterial interactions. *Ann Biomed Eng*. 1992;20:63-80.
11. Naeije R and Chesler N. Pulmonary circulation at exercise. *Comprehensive Physiology*. 2012;2:711-41.
12. Wong YY, Ruiter G, Lubberink M, Raijmakers PG, Knaapen P, Marcus JT, Boonstra A, Lammertsma AA, Westerhof N, van der Laarse WJ and Vonk-Noordegraaf A. Right ventricular failure in idiopathic pulmonary arterial hypertension is associated with inefficient myocardial oxygen utilization. *Circulation Heart failure*. 2011;4:700-6.
13. Wong YY, Westerhof N, Ruiter G, Lubberink M, Raijmakers P, Knaapen P, Marcus JT, Boonstra A, Lammertsma AA, van der Laarse WJ and Vonk-Noordegraaf A. Systolic pulmonary artery pressure and heart rate are main determinants of oxygen consumption in the right ventricular myocardium of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European journal of heart failure*. 2011;13:1290-5.
14. Tomanek RJ. Response of the coronary vasculature to myocardial hypertrophy. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:528-33.
15. Gomez A, Bialostozky D, Zajarias A, Santos E, Palomar A, Martinez ML and Sandoval J. Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1137-42.
16. Chin KM, Kim NH and Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coron Artery Dis*. 2005;16:13-8.

17. Wong YY, Raijmakers P, van Campen J, van der Laarse WJ, Knaapen P, Lubberink M, Ruiter G, Vonk Noordegraaf A and Lammertsma AA. ^{11}C -Acetate Clearance as an Index of Oxygen Consumption of the Right Myocardium in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension: A Validation Study Using ^{15}O -Labeled Tracers and PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2013;54:1258-62.
18. Bodi V, Husser O, Sanchis J, Nunez J, Lopez-Lereu MP, Monmeneu JV, Mainar L, Chaustre F, Riegger GA, Bosch MJ, Chorro FJ and Llacer A. Contractile reserve and extent of transmural necrosis in the setting of myocardial stunning: comparison at cardiac MR imaging. *Radiology*. 2010;255:755-63.
19. Melon PG, de Landsheere CM, Deguelldre C, Peters JL, Kulbertus HE and Pierard LA. Relation between contractile reserve and positron emission tomographic patterns of perfusion and glucose utilization in chronic ischemic left ventricular dysfunction: implications for identification of myocardial viability. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1651-9.
20. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM and Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest*. 1997;100:2315-24.
21. Guilhaire J, Haddad F, Boulate D, Capderou A, Decante B, Flecher E, Eddahibi S, Dorfmueller P, Herve P, Humbert M, Verhoye JP, Darteville P, Mercier O and Fadel E. Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33:194-202.
22. Blumberg FC, Arzt M, Lange T, Schroll S, Pfeifer M and Wensel R. Impact of right ventricular reserve on exercise capacity and survival in patients with pulmonary hypertension. *European journal of heart failure*. 2013;15:771-5.
23. Brookes C, Ravn H, White P, Moeldrup U, Oldershaw P and Redington A. Acute right ventricular dilatation in response to ischemia significantly impairs left ventricular systolic performance. *Circulation*. 1999;100:761-7.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Comparison of different metric of right ventricular contractile reserve between groups. PH group, n=13; Sham group, n=6.

PH: pulmonary hypertension; SVI: stroke volume index; Ees: end-systolic elastance. Relative SVI=(SVI max – SVI rest)/SVI rest; relative Ees=(Ees max-Ees rest)/Ees rest; relative dP/dt max=(dP/dt max – dP/dt rest)/dP/dt rest. # explain $P<0.01$ for between groups comparisons.

Figure 2. Relationships between indices of right ventricular contractile reserve and resting ventricular-arterial coupling.

Section A) The more ventricular-arterial coupling (Ees/Ea) was impaired, the more stroke volume index response to dobutamine stimulation (SVI max) was low. Severe uncoupling was defined by $Ees/Ea<0.7$; moderate uncoupling: $0.7<Ees/Ea<1.0$; preserved coupling: $Ees/Ea>1$ (n=19). **Sections B, C and D)** Relationships were best approximated through linear approach (n=19). Ees: end-systolic elastance; Ea: pulmonary arterial elastance. * and # explain respectively $P<0.05$ and $P<0.01$ for comparison between groups.

Figure 3. Diastolic reserve of the right ventricle and relationships with ventricular-arterial coupling.

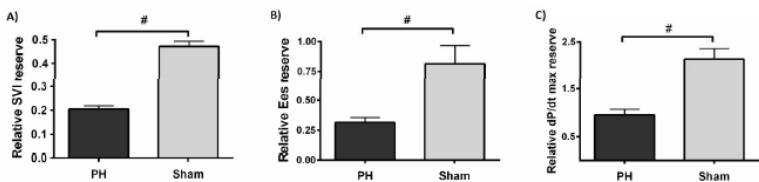
Diastolic reserve of the right ventricle, as assessed by the diastolic elastance (Ed) was defined by the RV end-diastolic pressure to stroke volume ratio. Ed was inversely associated with RV/PA coupling as illustrated by the Ees/Ea ratio. Animals with $Ees/Ea<0.7$ had a higher RVEDP/SV ratio, while animals with an efficient RV/PA coupling ($Ees/Ea>1$) had a low RVEDP/SV ratio (n=19).

* and # explain respectively $P<0.05$ and $P<0.01$ for comparison between groups. Other abbreviations are in text.

Figure 4. Molecular patterns of the pressure-overloaded right ventricle and relationships with RV reserve.

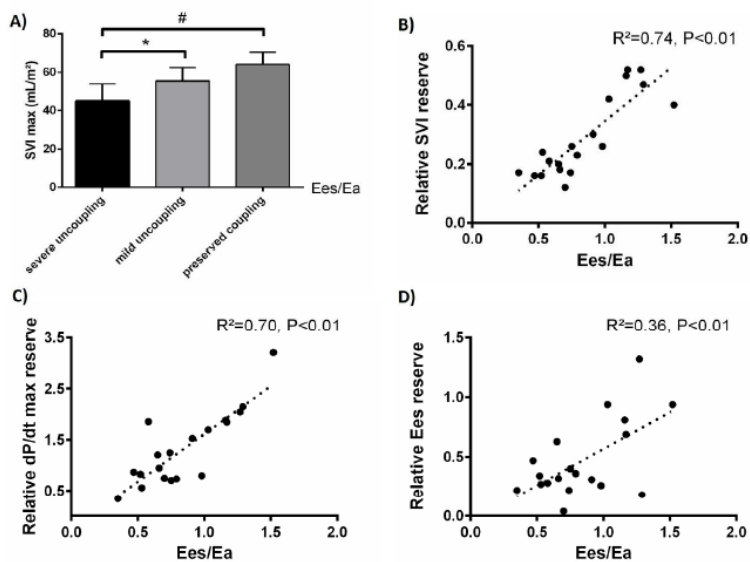
Brain natriuretic peptide (BNP) and β -myosin heavy chain (β -MHC) are over-expressed at 12 weeks in HYPPE group (n=7) compared to REPERFUSION (n=6) and SHAM groups (n=6) (Sections A and B). Right ventricular gene expression for BNP and β -MHC were inversely associated with stroke volume index measured after dobutamine stimulation (SVI max) (respectively through a non-linear and through a linear relationship; Sections C and D). * and # explain respectively $P<0.05$ and $P<0.01$ for comparison between resting and exercise variables in each group.

Figure 1. Comparison of different metric of right ventricular contractile reserve between groups. PH group, n=13; Sham group, n=6.



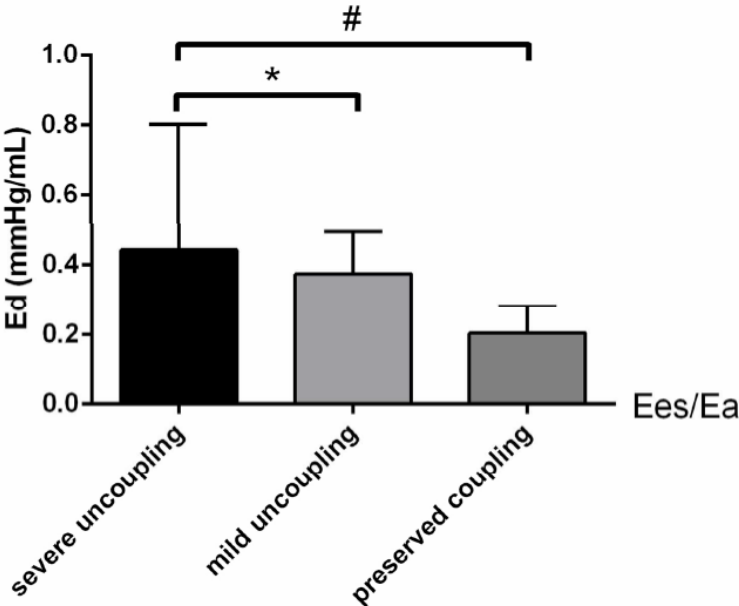
217x61mm (300 x 300 DPI)

Figure 2. Relationships between indices of right ventricular contractile reserve and resting ventricular-arterial coupling.



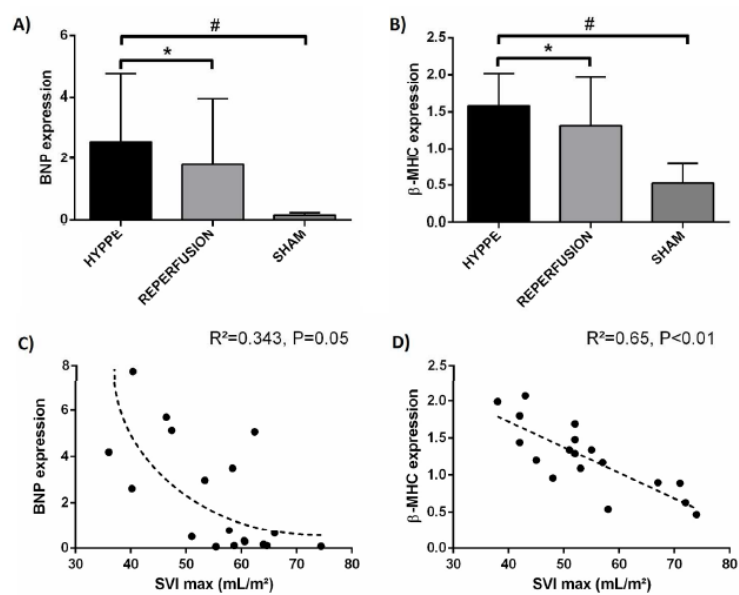
172x125mm (300 x 300 DPI)

Figure 3. Diastolic reserve of the right ventricle and relationships with ventricular-arterial coupling.



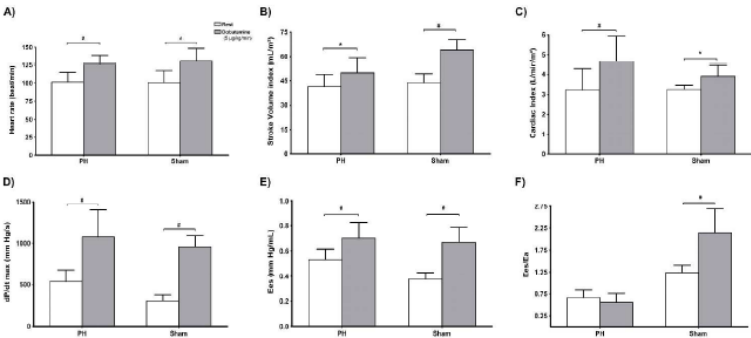
115x96mm (300 x 300 DPI)

Figure 4. Molecular patterns of the pressure-overloaded right ventricle and relationships with RV reserve.



159x120mm (300 x 300 DPI)

Supplemental Figure 1. Changes in right ventricular hemodynamics during exercise stress test. PH group, n=13; Sham group, n=6.



589x264mm (300 x 300 DPI)

Online supplementary material

Materials

Experimental model of chronic pulmonary hypertension

After premedication with ketamine hydrochloride 15 mg/kg intramuscularly, general anesthesia was induced with propofol 1% and maintained using continuous isoflurane inhalation for all procedures (surgery, right heart catheterization, conductance measurements, echocardiography). Pancuronium bromide 2 mg was administered intravenously for muscle relaxation. Mechanical ventilation through endo-tracheal intubation was performed with a rate of 10 per minute, a tidal volume of 15 to 20 ml/kg and a pulmonary end-expiratory pressure of 5 cm H₂O (Servo 900, Siemens-Elema AB, Solna, Sweden). Inspired oxygen fraction was adjusted to obtain stable peripheral oxygen saturation up to 95% during all procedures.

Sham surgical procedures were performed in 6 other piglets (Sham group), including midline sternotomy and 5 weekly injections of saline in the segmental arteries of the right lower lobe.

Conductance measurements

Synchronous pressure and volume signals were recorded at weeks 6 and 12 using a 4-Fr conductance-catheter (CD Leycom, Zoetermeer, The Netherlands) inserted in the right ventricle via percutaneous puncture of the right internal jugular vein. Another sensitive pressure catheter (Pulsion Medical Systems, Munich, Germany) was inserted in the right femoral artery to continuously monitor mean systemic blood pressure (MBP). Baseline measurements for stroke volume (SV), maximal (dP/dt max) and minimal (dP/dt min) rates of rise of RV pressure, relaxation time constant (tau) and RV stroke work were recorded. Stroke volume was indexed to BSA (SVI). An 8-Fr balloon-tipped catheter was introduced through the right femoral vein and positioned under fluoroscopic guidance in the inferior vena cava, just below the right atrial cavity (20-mm Occlusion Balloon Catheter, Boston Scientific/Medi-Tech, Watertown, MA, USA). It was inflated to transiently reduce RV inflow and assess end-systolic pressure-volume (PV) relationships.

Echography of the right ventricle

RV assessment by echocardiography was performed at week 6 under general anaesthesia, 10 minutes before right heart catheterization and PV loops measurements (Vivid E9, General Electric Medical System, Milwaukee, WI, USA). The maximal transverse diameter of the right ventricle (RVEDD) was measured at the end-diastolic time on a 4-chamber view (B-mode), as well as the RV end-diastolic area which was further indexed to the BSA (RVEDAI). The right ventricular fractional area change (RVFAC) was defined as the percent area change between end-diastole and end-systole (2D quantification). The right ventricular myocardial performance index (RVPMI) was calculated as the ratio of isovolumic contraction and relaxation time divided by contraction time (Pulse Doppler of the pulmonary and tricuspid valves). The tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) was measured using M-mode as the maximal excursion of the lateral part of the tricuspid annulus.

Supplemental Figure

Supplemental Figure 1. Changes in right ventricular hemodynamics during exercise stress test. PH group, n=13; Sham group, n=6.

PH: pulmonary hypertension; Ees: end-systolic elastance; Ea: pulmonary arterial elastance.

* and # explain respectively $P < 0.05$ and $P < 0.01$ for comparison between resting and exercise variables in each group.

4. TROISIEME ETUDE

Publication:

Plasticité du ventricule droit dans un modèle porcin de surcharge chronique de pression

Plasticity of the right ventricle in a porcine model of chronic pressure overload

Julien Guihaire, François Haddad, David Boulate, André Capderou, Benoît Decante, Erwan Flécher,

Saadia Eddahibi, Peter Dorfmueller, Philippe Hervé, Marc Humbert, Jean-Philippe Verhoye,

Philippe Darteville, Olaf Mercier, Elie Fadel

Journal Heart Lung Transplant. 2014;33(2);194-202

Communication orale:

**Amélioration de la fonction ventriculaire droite après traitement chirurgical de l'hypertension
pulmonaire post-embolique modélisée chez le porc**

**Improvement in right ventricular function after surgical treatment of chronic thromboembolic
pulmonary hypertension in a porcine model**

Julien Guihaire, Olaf Mercier, François Haddad, David Boulate, Benoît Decante,

Peter Dorfmueller, Saadia Eddahibi, Erwan Flécher, Elie Fadel

International Society for Heart and Lung Transplantation, 32th Annual Meeting and Scientific Sessions

Prague, République Tchèque, 19 Avril 2012

Journal Heart Lung Transplant. 2012;31(4):S79-S80 (abstract)

Etude expérimentale réalisée dans le *Laboratoire de Recherche Expérimentale* (Pr Fadel)

Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Inserm U999, Université Paris Sud.

Objectifs:

L'HTP reste une pathologie de mauvais pronostic malgré des progrès pharmacologiques majeurs au cours des vingt dernières années. La capacité du VD à s'adapter à l'élévation de sa post-charge est liée à son aptitude à augmenter sa masse ventriculaire et sa contractilité. Cette adaptation est cependant insuffisante et la dysfonction ventriculaire puis l'insuffisance cardiaque droite surviennent. Le couplage ventriculo-artériel quantifie la relation entre la contractilité du VD et sa post-charge. Il est optimal lorsque la majorité de la consommation myocardique en oxygène est dédiée à la production du travail mécanique du VD.

A ce jour, la relation entre le couplage VD/AP et le remodelage ventriculaire droit n'a pas été établie sur un modèle d'HTP progressive. Cette relation a été étudiée sur notre modèle porcin d'hypertension pulmonaire post-embolique. Nous émettons l'hypothèse que le découplage ventriculo-artériel survient tôt dans l'histoire de cette maladie. Nous avons également étudié les variations d'expression génique en fonction du degré de couplage VD/AP. Dans ce travail expérimental, nous avons comparé 3 groupes de 6 porcelets : un groupe HTP non traité, un groupe HTP avec traitement chirurgical de l'HTP à 6 semaines et un groupe contrôle.

Résultats:

Dans notre modèle, l'index cardiaque était comparable entre les groupes à 6 semaines. Les animaux exposés à une surcharge chronique de pression dans le VD présentaient une PAP moyenne et des RPT plus élevées (respectivement 32 ± 6 vs. 14 ± 2 mm Hg, $P < 0,01$; et 801 ± 272 vs. 348 ± 68 dynes.s.cm⁻⁵, $P < 0,01$). Nous observons une relation forte entre le degré de couplage ventriculo-artériel, le remodelage ventriculaire droit et la fonction systolique. Il existait une relation linéaire entre la surface télédiastolique indexée du VD et le couplage VD/AP ($R^2=0,48$, $P < 0,01$). De même, l'altération du couplage était associée à une baisse significative du RVFAC ($R^2=0,84$, $P < 0,01$).

En réponse au traitement chirurgical de l'HTP, nous avons observé une diminution significative de la PAP moyenne à 12 semaines (30 ± 4 vs. 21 ± 2 mm Hg, $P < 0,01$). La diminution de la post-charge du VD s'accompagnait d'une correction du remodelage ventriculaire avec diminution de la dilatation du VD ($10,7 \pm 1,8$ vs. $8,1 \pm 0,8$ cm², $P=0,02$) et à une amélioration de la fonction

systolique mesurée par le RVFAC ($25\% \pm 5\%$ vs. $42\% \pm 7\%$, $P < 0,01$). De même, la reperfusion du poumon gauche s'associait à une amélioration du couplage VD/AP ($0,73 \pm 0,12$ vs. $1,08 \pm 0,05$, $P < 0,01$). La diminution de la post-charge du VD s'associait à une plus faible expression du BNP et de la chaîne légère β de la myosine cardiaque ($P < 0,01$ et $P < 0,01$). Le couplage ventriculo-artériel et la masse ventriculaire droite étaient positivement associés à l'expression du BNP et de la chaîne légère β de la myosine cardiaque.

Limites:

Il s'agissait d'un modèle compensé de remodelage ventriculaire droit. Nous avons déjà rapporté l'effet « protecteur » de l'ouverture du péricarde sur l'interdépendance ventriculaire dans la surcharge chronique barométrique. Par ailleurs il s'agissait d'un modèle d'embolisations aiguës répétées davantage que d'un modèle de surcharge de pression progressif et linéaire. La mesure du volume ventriculaire était effectuée par la méthode de conductance ventriculaire et non pas par IRM cardiaque. Enfin les observations génotypiques n'ont pas été confirmées par une analyse d'expression protéique en Western blot au sein du myocarde ventriculaire droit.

Conclusion:

Nous rapportons dans cette étude que le couplage ventriculo-artériel est fortement associé au remodelage ventriculaire droit et à l'expression génique du BNP et de la chaîne légère β de la myosine cardiaque dans un modèle expérimental d'HTP chronique. Notre modèle de reperfusion pulmonaire 6 semaines après l'induction d'une HTP suggère par ailleurs que le couplage VD/AP pourrait être un marqueur prédictif de réponse au traitement dans l'HTP chronique.

Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload

Julien Guihaire, MD, MSc,^a François Haddad, MD,^b David Boulate, MD, MSc,^a André Capderou, MD, PhD,^a Benoît Decante, MSc,^a Erwan Flécher, MD, PhD,^c Saadia Eddahibi, PhD,^d Peter Dorfmueller, MD, PhD,^d Philippe Hervé, MD,^a Marc Humbert, MD, PhD,^d Jean-Philippe Verhoye, MD, PhD,^c Philippe Dartevielle, MD,^a Olaf Mercier, MD, PhD,^a and Elie Fadel, MD, PhD^a

From the ^aLaboratory of Surgical Research and INSERM U999, University of Paris-Sud, Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis Robinson, France; ^bDivision of Cardiovascular Medicine, Stanford University, Palo Alto, California; ^cDepartment of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital of Rennes, Rennes, France; and ^dFaculté de médecine, Kremlin-Bicêtre, AP-HP, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, INSERM U999, Marie Lannelongue Hospital, University of Paris-Sud, Le Plessis Robinson, France.

KEYWORDS:

right ventricle;
pulmonary
hypertension;
animal model;
ventricular–arterial
coupling

BACKGROUND: Ventricular–arterial coupling is a measure of the relationship between ventricular contractility and afterload. We sought to determine the relationship between ventricular–arterial coupling and right ventricular (RV) remodeling in a novel porcine model of progressive pulmonary hypertension (PH).

METHODS: Chronic PH was induced in pigs by ligation of the left pulmonary artery (PA) followed by 5 weekly injections of cyanoacrylate to progressively obstruct the right lower lobe arteries (PH group, $n = 10$). At 6 weeks, 5 PH animals underwent reperfusion of the left lung through conduit anastomosis to decrease RV afterload, whereas 5 other animals received no treatment. Five sham-operated piglets were used as controls. RV function was assessed using echocardiography and conductance catheterization. RV gene expression of beta-myosin heavy chain (β -MHC) and B-type natriuretic peptide (BNP) were quantified by polymerase chain reaction.

RESULTS: At 6 weeks, compared with controls, the PH group had higher mean PA pressure (32 ± 6 vs 14 ± 2 mm Hg, $p < 0.01$). The increase in RV elastance was insufficient to compensate for the increase in pulmonary arterial elastance in the PH group and altered ventricular–arterial coupling occurred (0.65 ± 0.16 vs 1.28 ± 0.14 , $p < 0.01$). The degree of ventricular–arterial uncoupling was related to RV enlargement and systolic dysfunction. Ventricular–arterial uncoupling and increased RV mass index were associated with up-regulation of β -MHC and BNP expression.

CONCLUSIONS: Ventricular–arterial coupling is closely associated with ventricular remodeling and systolic function as well as contractile and BNP gene expression. Dynamic changes in myosin expression may determine RV work efficiency in PH.

J Heart Lung Transplant 2014;33:194–202

© 2014 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.

Reprint requests: Julien Guihaire, MD, MSc, Laboratory of Surgical Research and INSERM U999, University of Paris-Sud, Marie Lannelongue Hospital, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson, France. Telephone: +33-140942800; Fax: +33-146303792.

E-mail address: julien.guihaire@u-psud.fr

1053-2498/\$ - see front matter © 2014 International Society for Heart and Lung Transplantation. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhltonline.2013.10.026>

Right ventricular (RV) failure is the main cause of mortality in patients with pulmonary arterial hypertension (PH) and in inoperable chronic thromboembolic PH (CTEPH).^{1–3} In studies addressing hemodynamic variables and survival in PH, high mean right atrial pressure and low

cardiac output are consistently associated with poorer survival.^{4,5} The ability of the RV to adapt to the increase in afterload is related to its potential to increase its ventricular mass and contractility. However, this compensation is often insufficient and RV dysfunction and failure may ensue. Right ventricular–pulmonary arterial (RV-PA) coupling describes the relationship between RV contractility and RV afterload. Optimal RV-PA coupling has been associated with maximal efficiency between hydraulic work production and myocardial oxygen consumption.⁶ Its most reliable metric is the ratio of ventricular elastance on arterial elastance based on pressure–volume loop analyses.

To date, the relationship between ventricular–arterial coupling and RV remodeling has not been well established in a model of progressive PH. For this study, we hypothesized that RV-PA uncoupling occurs early in the development of PH and is related to the degree of ventricular remodeling. We further hypothesized that beta-myosin heavy chain (β -MHC) and B-type natriuretic peptide (BNP) gene expressions will increase with greater uncoupling.

To analyze the relationship between ventricular–arterial coupling and ventricular remodeling, we developed a novel large-animal model of progressive RV pressure overload. Using this model, we were able to study RV structure and function during both the development and recovery of chronic pressure overload.

Methods

Animals and experimental design

Twenty-one 2-month-old Large White piglets with a mean weight of 25.1 ± 5.7 kg were used in these experiments. Piglets were randomized to a sham operation (control group) or to PH induction

(PH group), followed after 6 weeks by either PH surgical treatment (REP group) or observation (NO-REP group). All animals were euthanized using a lethal intravenous potassium infusion at 12 weeks (Figure 1). The research protocol was approved by our institutional committee on animal welfare and all animals received humane care in compliance with the “Principles of Laboratory Animal Care,” formulated by the National Society for Medical Research, and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996).

Induction of pulmonary hypertension and sham operation

The anesthetic protocol for piglets is described in the [supplementary material](#) (available online at www.jhltonline.org/). Proximal complete ligation of the left pulmonary artery (PA) was performed after opening the pericardium via a mid-line sternotomy using a 4-mm strength suture (Surgical Loop; B. Braun, Tuttlingen, Germany). The pericardium was kept opened. Embolization of right lower lobe arteries was realized 1 week later. A soft tissue adhesive, *n*-butyl-2-cyanoacrylate (Histoacryl; B. Braun, Tuttlingen, Germany), was selectively injected under fluoroscopic control to progressively occlude pulmonary segmental arteries and embolization procedures were repeated weekly for 5 weeks.⁷ Sham procedures consisted of weekly embolization of saline solution for 5 weeks, without previous ligation of the left PA (Figure 1).

Surgical treatment of experimental pulmonary hypertension

One week after the last embolization procedure, surgical reperfusion of the left lung was performed under general anesthesia in half of PH animals. This *in vivo* reperfusion aimed to durably decrease pulmonary vascular impedance using an 8-mm-diameter

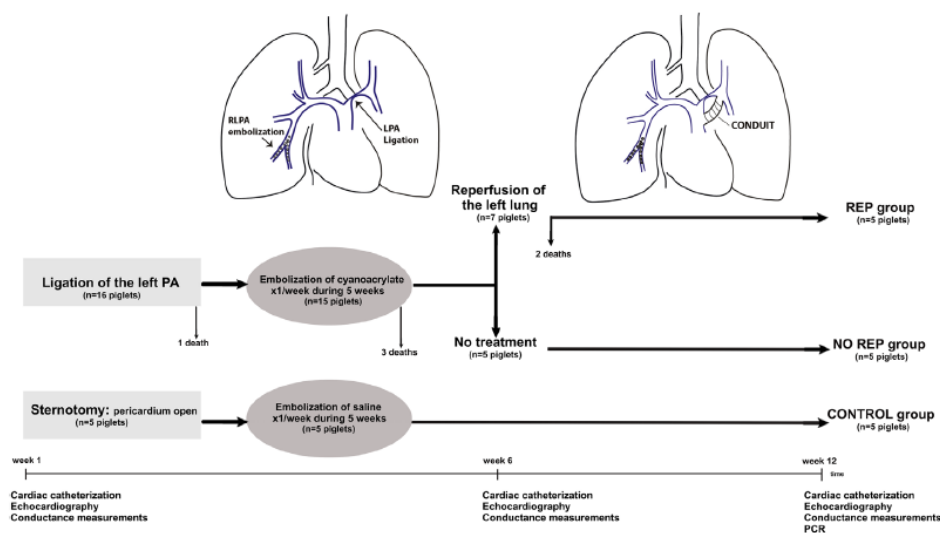


Figure 1 The study was performed in two successive phases. Part I consisted of ligation of the left pulmonary artery (LPA) followed by weekly injection of *n*-butyl-2-cyanoacrylate in the right lower pulmonary artery (RLPA). Part II consisted of either a conduit anastomosis of the main pulmonary artery (PA) to the left pulmonary artery (LPA) or observation.

polytetrafluoroethylene conduit implanted between main and left PA, on both sides of the previous ligation (Figure 1). The NO-REP group and sham animals underwent thoracotomy at 6 weeks without reperfusion of the left lung.

Right heart catheterization

Pulmonary hemodynamics data were recorded at baseline and 6 and 12 weeks. A thermistor-tipped 7F catheter (Edwards LifeSciences, Irvine, CA) was pushed into the right PA to record mean pulmonary artery pressure (MPAP) and cardiac output (CO). The ventilator was transiently turned off during all measurements. Total pulmonary resistance (TPR) levels were expressed in dynes/cm⁵ and calculated as follows: $TPR = (MPAP \times 80) / CO$. TPRs were preferred to pulmonary vascular resistance in order to estimate resistive component of the pulmonary vascular load. Expansion of the systemic supply to the lung is known to occur after chronic occlusion of PA in piglets.⁸ Hypertrophy of the bronchial circulatory system may influence pulmonary capillary wedge pressure and thus could disrupt measurement of pulmonary vascular resistance.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed under general anesthesia at baseline and 6 and 12 weeks, just before right heart catheterization. Measurements were recorded by ultrasound (Vivid E9; General Electric Medical System, Milwaukee, WI) and analyzed on a comprehensive workstation (EchoPAC Dimension '06, General Electric Medical System) by two readers (J.G. and F.H.) blinded to invasive hemodynamic measures. RV end-diastolic and end-systolic areas (RVEDA and RVESA) were measured in the 2-dimensional 4-chamber view. The RV fractional area change (RVFAC) was measured as the percentage of area change between RVEDA and RVESA. The tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) was measured using M-mode as the maximal excursion of the RV lateral annulus.

Pressure–volume loops assessment and analysis

RV contractile performance was assessed at baseline and at 6 and 12 weeks using conductance catheterization.⁹ Details about the pressure–volume loop recordings are presented in the [supplementary material](#) online. RV stroke volume (SV) was measured using pressure–volume loops. The slope of the linear end-systolic relationship defined RV end-systolic elastance (E_{es}). Pulmonary arterial elastance (E_a) was calculated as the ratio of RV end-systolic pressure to SV, both recorded at the same time. Right ventricular–pulmonary arterial (RV-PA) coupling was measured by the ratio of E_{es} to E_a (E_{es}/E_a).

To correct for growth variability between animals, CO, SV and RVEDA were indexed (CI, SVI and RVEDAI) to body surface area (BSA) following the equation of Kelley et al for piglets: $BSA (cm^2) = 734 \times weight^{0.656}$.¹⁰

Morphometry of the RV

On the excised heart specimen, the RV was dissected from the left ventricle and from the interventricular septum. The RV wall was completely removed from the tricuspid annulus to the pulmonary valve. The RV weight was normalized to body surface area (RV mass index). After fixation in 4% buffered formalin solution,

paraffin-embedded tissues of the RV were serially sectioned (5 μ m) for subsequent hematoxylin–eosin staining. The cross-sectional area (CSA) of 20 randomized cardiomyocytes was measured in the sub-epicardial layer of the RV wall (magnification 400 $\times$). The mean CSA for 1 animal corresponds to the average of 5 different fields.

Reverse transcription polymerase chain reaction assay

Total RNA was prepared from snap-frozen RV samples and quantified according to a method described previously.¹¹ Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed according to the manufacturer's protocol for BNP and beta-myosin heavy chain (β -MHC) with pig-specific primers (#Ss03392423_m1 and #Ss03392411_m1, respectively; Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Tissue expression of β -MHC and BNP was normalized to that of 18S gene for each sample.

Statistical analysis

Only animals that reached the final time-point of the study (12 weeks) were included in the statistical analysis ($n = 5$ per group). A 2-way-repeated measures analysis of variance (ANOVA) with the variables time and group was used to analyze the cardiopulmonary remodeling over time. One-way ANOVA was performed with a Fisher's test for between-group comparisons. For each between-variable relation, we approximated the relationship—that is, linear, logarithmic, inverse or exponential equations. A multivariable regression model including as covariates ventricular–arterial coupling and RV mass index was used to determine whether both factors were independently associated with BNP or β -MHC expression. All statistical analyses were performed using STATVIEW version 4 software (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Results

Part I: Induction of experimental PH in piglets

Changes in pulmonary hemodynamics and RV remodeling. Table 1 summarizes the characteristics of the piglets at 6 weeks. Compared with controls, the PH group had higher MPAP and TPR at 6 weeks, as well as higher RVEDAI (6.2 ± 1.3 vs 10.6 ± 2.4 cm²/m², $p < 0.001$) (Figure 2). RV systolic dysfunction also developed as reflected by significant decrease in both RVFAC and TAPSE over the same period ($44.8 \pm 9.1\%$ vs $27.8 \pm 6.2\%$, $p < 0.001$; and 1.89 ± 0.17 vs 1.41 ± 0.27 cm, $p < 0.001$, respectively) (Figure 2). In our model, cardiac index (CI) was comparable between groups, suggesting compensated RV dysfunction at rest (Figure 2).

Ventricular elastance and ventricular–arterial coupling and its relationship to ventricular remodeling. Whereas ventricular elastance was increased in the PH group (0.46 ± 0.06 at baseline vs 0.50 ± 0.06 mm Hg/ml at 6 weeks, $p < 0.01$), ventricular–arterial coupling was significantly decreased (1.38 ± 0.17 mm Hg/ml at baseline vs 0.65 ± 0.16 mm Hg/ml at 6 weeks, $p < 0.001$) (Figure 3). In our model, the relationship between E_{es} and E_a could be approximated by a curvilinear relationship with a regression coefficient R^2

Table 1 Characteristics of Control and PH Groups at 6 Weeks

	Control group (n = 5)	PH group (n = 10)	p
Weight (kg)	30 ± 2	31 ± 6	0.74
Hemodynamics			
HR (beat/min)	75 ± 7	80 ± 9	0.85
RAP (mm Hg)	5 ± 2	8 ± 2	0.04
MPAP (mm Hg)	14 ± 2	32 ± 6	<0.01
CI (liters/min/m ²)	3.2 ± 0.2	3.4 ± 1	0.67
SVI (ml/m ²)	43 ± 6	43 ± 7	0.97
TPR (dynes/s/cm ⁵)	348 ± 68	801 ± 272	<0.01
Pressure-volume loops			
E _{es} (mm Hg/ml)	0.39 ± 0.05	0.53 ± 0.09	<0.01
E _a (mm Hg/ml)	0.30 ± 0.06	0.77 ± 0.1	<0.01
E _{es} /E _a	1.28 ± 0.14	0.68 ± 0.12	<0.01
dP/dt _{max} (mm Hg/s)	286 ± 88	581 ± 143	<0.01
dP/dt _{min} (mm Hg/s)	-244 ± 65	-655 ± 213	<0.01
Echocardiography			
RVEDAI (cm ² /m ²)	4.6 ± 0.6	10.6 ± 2.4	<0.01
RVFAC (%)	52 ± 9	26 ± 5	<0.01
TAPSE (cm)	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.2	<0.01

Results are presented as mean value ± SD. CI, cardiac index; dP/dt_{max}, right ventricular maximal isovolumic rate of development of ventricular pressure; dP/dt_{min}, right ventricular minimal isovolumic rate of development of ventricular pressure; E_a, pulmonary arterial elastance; E_{es}, right ventricular end-systolic elastance; E_{es}/E_a, ratio reflecting efficiency of ventricular-arterial coupling. HR, heart rate; MPAP, mean pulmonary artery pressure; RAP, right atrial pressure; RVEDAI, right ventricular end-diastolic area index; RVFAC, right ventricular fractional area change; SVI, stroke volume index; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; TPR, total pulmonary resistance.

of 0.64, $p < 0.01$ (Figure 4A). If a threshold of E_{es}/E_a of 1 is used, sub-optimal RV-PA coupling occurred with mild elevation of pulmonary vascular load and worsened with higher levels of E_a (Figure 4A). There was a significant relationship between ventricular-arterial coupling and RV remodeling and systolic function. These relations were best approximated through linear relationships. RVEDAI was inversely associated with RV-PA coupling ($R^2 = 0.48$, $p < 0.01$). Worsening RV-PA coupling was associated with a significant decrease in RVFAC ($R^2 = 0.84$, $p < 0.01$). In our model, SVI was

preserved in the majority of pigs with PH ($> 35 \text{ ml/m}^2$) and was not associated with RV-PA coupling ($R^2 = 0.08$, $p = 0.30$).

Part II: Effects of surgical treatment of PH in piglets

Dynamic changes in pulmonary hemodynamics, RV geometry and function after reperfusion of PH animals. The REP and NO-REP groups were matched for the degree of RV-PA

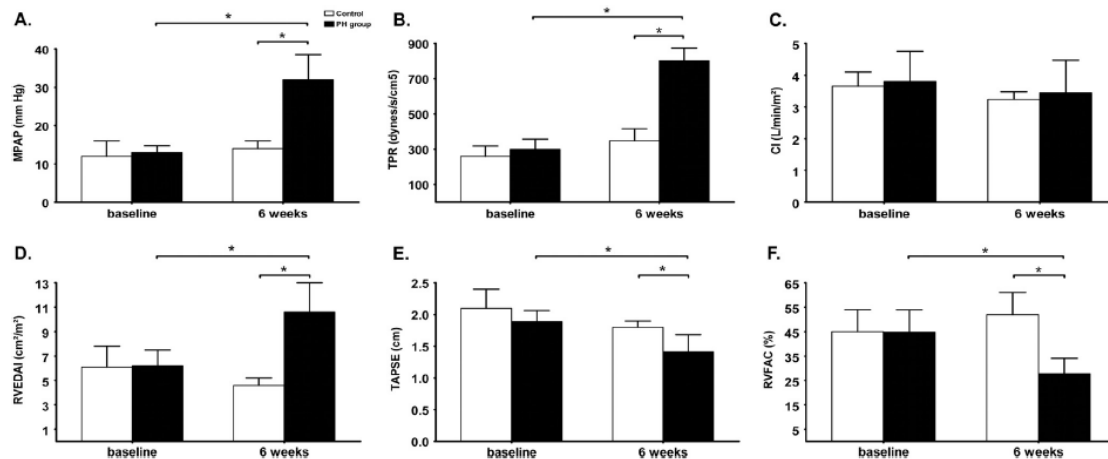


Figure 2 (A, B) Experimental PH was associated with significant changes in mean pulmonary artery pressure (MPAP) and total pulmonary resistance (TPR) at 6 weeks. (C) This model was not associated with remarkable changes in cardiac index (CI). (D–F) Chronic pressure overload resulted in increased RV end-diastolic area index (RVEDAI), whereas a decrease in both RV fractional area change (RVFAC) and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) was observed over the same period. Column graphs show mean ± SEM. $p < 0.001$.

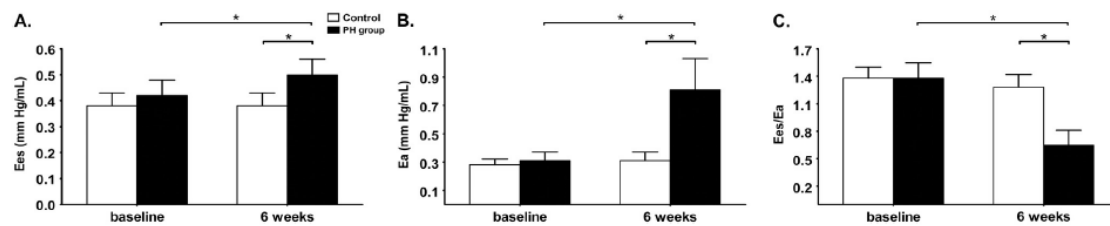


Figure 3 (A, B) Significant increase in RV end-systolic elastance (E_{es}) and pulmonary arterial elastance (E_a) at 6 weeks after induction of PH. (C) Because the increase in E_{es} was not sufficient to compensate for the increased E_a , there was impaired ventricular-arterial coupling (E_{es}/E_a). Column graphs show mean $\pm$ SEM. * $p < 0.001$.

uncoupling 6 weeks after PH induction. Pulmonary angiography showed persistent patency of the conduit at 1 and 3 weeks after the left lung reperfusion procedure in all animals in the REP group. As summarized in Figure 5A, reperfusion of the left lung resulted in a significant decrease in MPAP at 12 weeks (30 ± 4 vs 21 ± 2 mm Hg, respectively, between 6 and 12 weeks, $p = 0.004$), whereas

the NO-REP group showed a trend for increased pulmonary pressures over the same period (34 ± 8 vs 41 ± 4 mm Hg, $p = 0.15$). The correction of RV after-load was associated with a decrease in RV enlargement measured by the RVEDAI (10.7 ± 1.8 vs 8.1 ± 0.8 cm²/m², $p = 0.02$) (Figure 5B). Similarly, RV systolic function was improved after surgical treatment of PH (RVFAC: $25 \pm 5\%$ vs $42 \pm 7\%$, $p = 0.002$) (Figure 5C). In the REP group, E_a decreased by 53% (0.70 ± 0.14 vs 0.33 ± 0.03 mm Hg/mL, $p < 0.001$) and E_{es}/E_a increased by 32% (0.73 ± 0.12 vs 1.08 ± 0.05 , $p < 0.001$), whereas no significant change was noted in the NO-REP group between 6 and 12 weeks (Figure 5D). The relationships between change in RV-PA coupling and changes in RVEDAI ($R^2 = 0.33$, $p < 0.001$) and RVFAC ($R^2 = 0.43$, $p < 0.001$) could be estimated through a linear approximation (refer to Figure 1 in supplementary material online).

Myocardial mass and changes in BNP and β -MHC expression after PH surgical treatment. At 12 weeks, cardiomyocytes hypertrophy of the RV was observed among animals who did not undergo reperfusion of the left lung (298 ± 36 μ m²), whereas the CSA of the cardiomyocytes was not significantly different between the REP group and controls (216 ± 16 vs 171 ± 15 μ m², $p < 0.001$, respectively) (Figure 6B). There was a negative linear relationship between RV-PA coupling and the size of RV cardiomyocytes, showing that ventricular-arterial uncoupling may occur despite cardiomyocytes hypertrophy (Figure 6C). Correction of pressure overload was associated with a lower expression of BNP and β -MHC in the RV compared with non-treated animals ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 7A and B). RV-PA coupling and RV mass were related to tissue expression of BNP and β -MHC (Figure 7C–F). For RV-PA coupling and BNP expression, we observed an inverse relationship ($R^2 = 0.91$, $p < 0.001$), whereas the relationship between RV mass index and BNP expression was best estimated by an exponential approximation ($R^2 = 0.80$, $p < 0.001$). Using linear regression analysis, both RV-PA coupling ($p = 0.01$) and RV mass index ($p = 0.03$) were related to tissue expression of BNP ($R^2 = 0.84$, $p < 0.001$). RV-PA coupling and RV mass were best approximated with tissue expression of β -MHC through a linear relationship ($R^2 = 0.75$, $p < 0.001$, and $R^2 = 0.71$, $p < 0.001$, respectively). Using linear regression analysis, both RV-PA coupling ($p = 0.01$) and RV mass index ($p = 0.02$) were related to tissue expression of β -MHC ($R^2 = 0.83$, $p < 0.001$).

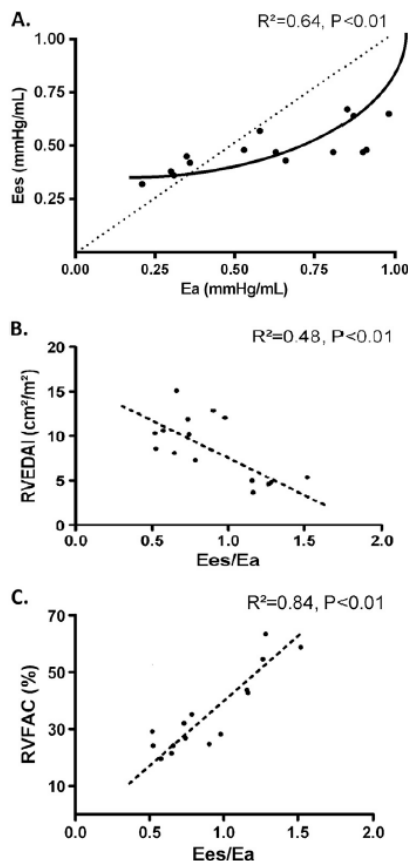


Figure 4 (A) The relationship between RV elastance (E_{es}) and pulmonary arterial elastance (E_a) was approximated through a curvilinear estimation. The stippled straight line passing through the origin represents $E_{es}/E_a = 1$. (B, C) RV end-diastolic area index (RVEDAI) and RV fractional area change (RVFAC) showed a negative and positive linear relationship, respectively, to E_{es}/E_a .

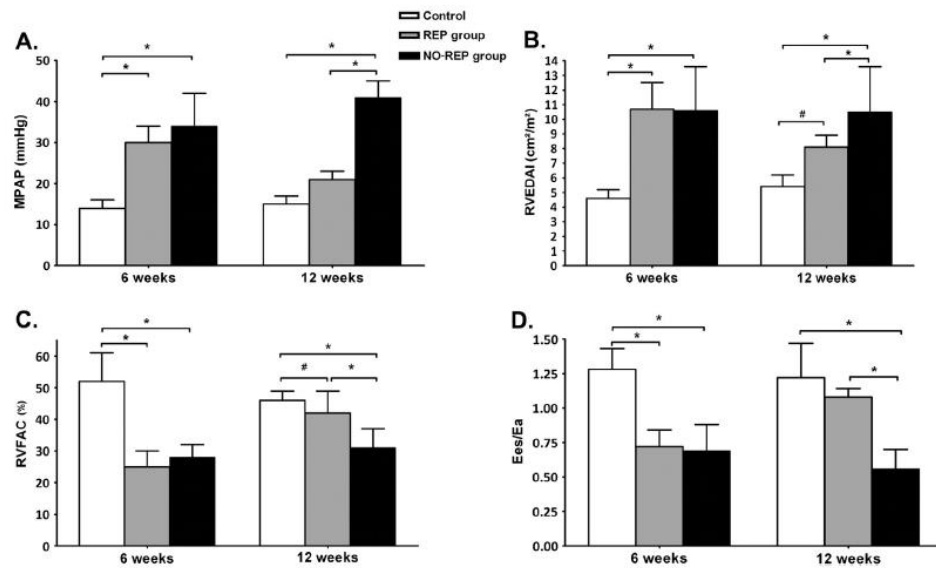


Figure 5 (A, B) Mechanical reduction of the RV after-load resulted in decreased mean pulmonary artery pressure (MPAP) and RV end-diastolic area index (RVEDAI) at 12 weeks. (C, D) Similarly, improvement of systolic function, as measured by RV fractional area change (RVFAC), and increased ventricular-arterial coupling (E_{es}/E_a) were observed in the reperfusion (REP) group 6 weeks after reperfusion of the left lung. RV enlargement and systolic dysfunction and ventricular-arterial uncoupling remained remarkable at 12 weeks in the non-reperfusion (NO-REP) group. Column graphs show mean $\pm$ SEM ($^{\#}p < 0.05$; $*p < 0.001$).

Morbidity and mortality of animal experiments. In this study, 1 animal died during the left PA ligation procedure. Three animals died from acute RV failure after the third embolization of the right lower lobe. Two PH animals died from acute pulmonary edema related to reperfusion-induced lung injury during PH surgical treatment at Week 6.

Discussion

The main finding of our study is that ventricular-arterial coupling is strongly related to RV remodeling and to β -MHC and BNP gene expression in chronic PH. Our results also suggest that altered ventricular-arterial coupling

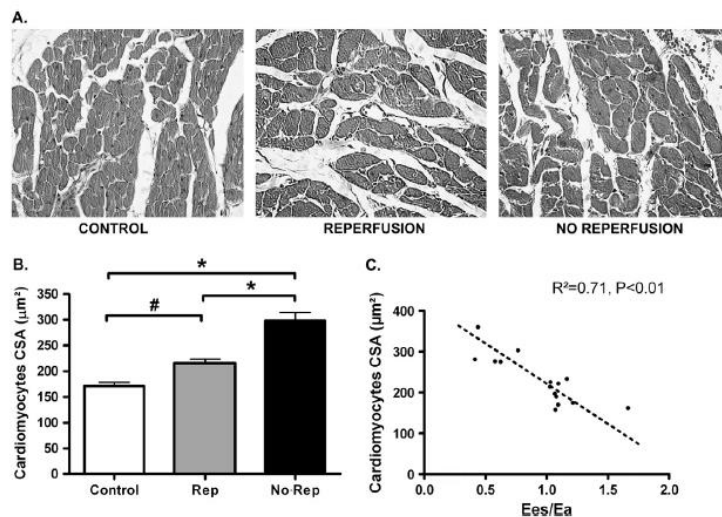


Figure 6 (A) Hematoxylin-eosin staining of the sub-epicardial layer of the RV free wall (original magnification $\times 400$). (B) Persistent PH was associated with a significant increase in cardiomyocytes cross-sectional area (CSA), whereas reduction of RV after-load resulted in a significant decrease in cardiomyocytes hypertrophy. (C) The relationship between cardiomyocytes CSA and right ventricular-pulmonary arterial coupling (E_{es}/E_a) was best estimated through a negative linear approximation. Column graphs show mean $\pm$ SEM ($^{\#}p < 0.05$; $*p < 0.001$). See text for other abbreviations.

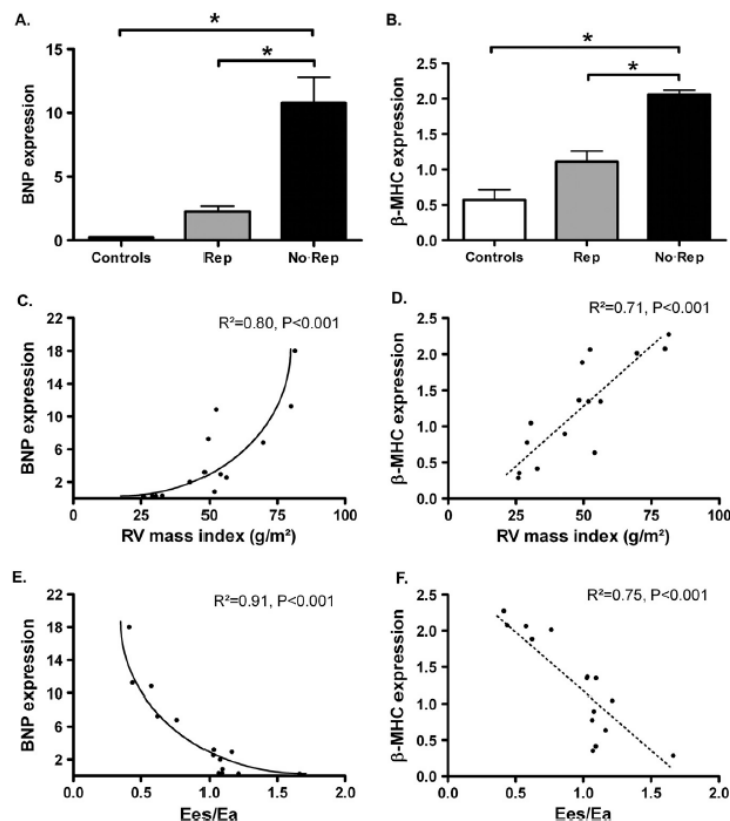


Figure 7 (A, B) Tissue expression of B-type natriuretic peptide (BNP) and β -myosin heavy chain (β -MHC) was normalized to that of 18S gene for each sample. Overexpression of BNP and β -MHC genes in the overloaded RV was reversed 6 weeks after reperfusion of the left lung. (C–F) Relations between ventricular–arterial coupling (E_{es}/E_a), RV mass index and tissue expression of BNP and β -MHC. Relationships with BNP can be approximated with exponential curvilinear estimations (C, E), whereas the relationships with β -MHC can be best approximated by linear estimations (D, F). Column graphs show mean $\pm$ SEM (* $p < 0.001$). See text for other abbreviations.

occurs early with the development of PH. For this study, we utilized a novel large-animal model of chronic RV pressure overload that allows us to generate PH of varying severity. In addition, the pulmonary conduit anastomosis provides an opportunity to study reverse remodeling of the RV.

Several earlier clinical and experimental studies have shown that the RV adapts to chronic pressure overload states by increasing its ventricular mass and contractility.^{12,13} This homeometric adaptation of ventricular inotropism may be mediated by a release of endogenous catecholamines associated with intracellular changes in calcium metabolism.^{14,15} However, studies have also shown that the increase in ventricular contractility is insufficient to compensate for the increase in afterload, and altered ventricular–arterial coupling occurs.^{16–19} The main exception to this is in patients with congenital heart disease and Eisenmenger's physiology, in whom the RV may maintain its systolic performance in the presence of severe PH.²⁰ Ventricular–arterial coupling is an important determinant of cardiac performance and energetics. Lambermont and D'Orio observed that when the RV and the pulmonary vasculature are efficiently coupled, minimal energy is

wasted in pulse pressure, although maximal energy is transmitted in the mean pressure.²¹ In our model, RV-PA uncoupling occurred with the development of PH, consistent with previous clinical observations.²² More interestingly and novel in our study, is that we showed that the degree of altered ventricular–arterial coupling occurred with the development of mild PH; furthermore, ventricular elastance appeared to be related to arterial elastance through a curvilinear relationship, suggesting a steeper decrease in coupling when arterial elastance transitions from mild to moderate levels. This finding suggests that there may be a zone of transition where the decrease in ventricular–arterial coupling is more important relative to the increase in arterial elastance. Moreover, as RV-PA coupling ratio can be reduced to $SV / (RV \text{ end-systolic volume} - V_0)$, where V_0 is the theoretical volume when no pressure is generated, impairment of RV-PA coupling is associated with the increased change in RV volume required to achieve SV, whereas increase in SV is moderate.

In this study we have reported for the first time a significant correlation between expression of MHC isoforms and RV-PA coupling. The MHC is a major determinant of

contractile performance and consists of two different isoforms in mammalian hearts. Beta-myosin heavy chain (β -MHC) is predominant in the human and porcine healthy heart (70% to 90%), whereas alpha-myosin heavy chain (α -MHC) accounts only for 10% to 30% of all MHC isoforms.²³ No significant difference in MHC distribution has been reported between RV and LV, although these two isoforms display inherent enzymatic and mechanical properties.²⁴ β -MHC is mainly involved in weak contractions with slow shortening velocity, whereas α -MHC is a faster mechano-enzyme able to generate a greater force.²³ We found that, among animals with persistent elevated RV afterload, β -MHC expression was higher than in treated animals. α -MHC expression could not be directly quantified in our study because of absence of pig-specific primers for α -MHC messenger RNA. The change in β -MHC is, however, theoretically associated with a reciprocal decrease in α -MHC as the two isoforms are related to each other.²³ In our study, we have shown that RV-PA uncoupling is related to an increase in the β -MHC isoform. Improvement of RV function after revascularization may parallel the increasing α/β MHC ratio.

The expression of BNP increases in patients with RV pressure overload. In patients with PH, elevated BNP seric level is associated with increased likelihood of mortality, especially when it remains elevated after therapy.^{25–27} Clinical studies have shown that serum concentration of BNP is related to RV mass and enlargement. In our study, we showed that ventricular mass is a major determinant of BNP tissue expression and that the relationship could be approximated by a curvilinear function, suggesting only mildly increased BNP expression in mildly uncoupled hypertrophied myocardium (recovering myocardium). Using linear modeling, both RV mass and RV-PA coupling were major determinants of BNP tissue expression.

Clinical implications

Despite major pharmacologic advances in the last decade, PH remains a deadly disease mainly secondary to the development of RV failure. In this study we sought to provide a particular insight into RV pathophysiology. The development of large-animal models may improve our understanding of the mechanisms involved in the transition from RV adaptive hypertrophy to maladaptive remodeling and failure in conditions of chronic pressure overload. Our model also supports the growing evidence that RV-PA coupling may be useful to investigate the progression of PH and its response to therapy. If further validated by clinical studies, it may be a promising marker of prognosis for the chronically overloaded RV. However, the best approach to practical measurement of ventricular–arterial coupling in PH patients is still a matter of debate.^{19,22}

Study limitations

In our model, the pericardium remained opened after left PA ligation. An adverse effect of RV enlargement on CO has

been demonstrated to be significantly lower when the pericardium is open.²⁸ Our model is therefore more reflective of compensated chronic RV dysfunction than of RV failure. As RV remodeling resulted from acute elevations of RV afterload, our findings may not reflect the chronic development of human PH. A more chronic model may not be associated with early impairment of RV-PA coupling for mild PH. Furthermore, we did not assess RV volume and mass by the “gold standard” of cardiac magnetic resonance imaging (MRI).^{22,29} Finally, we did not perform Western blot assays to determine whether changes observed in gene expression are associated with variations in protein synthesis. If translated into similar changes at the post-transcriptional level, decreased expression of α -MHC and a reciprocal increase of β -MHC may significantly impair contractile performance of the RV.

In conclusion, we have shown for the first time the strong relationship between ventricular–arterial coupling and structural, functional and molecular remodeling of the RV in a chronic pressure overload state. Future studies will help to determine the molecular mechanisms of RV adaptation to pressure overload during both the development and recovery of PH.

Disclosure statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

We thank the team at the Laboratory of Surgical Research, Marie Lannelongue Hospital, for technical assistance and animal care. This study was supported by the Association chirurgicale pour le développement et l'amélioration des techniques de dépistage et de traitement des maladies cardio-vasculaires (ADETEC, Suresnes, France). The Vivid E9 cardiac ultrasound system (General Electric Medical System) was financed by a grant from the Cardio-vasculaire-Obésité Domaine D'Intérêt Majeur (CODDIM cod100158, Région Ile-de-France, France).

Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at www.jhltonline.org/.

References

- Humbert M. Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur Respir Rev* 2010;19: 59–63.
- Hoepfer MM, Mayer E, Simonneau G, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 2006;113:2011–20.
- Pepke-Zaba J, Delcroix M, Lang I, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry. *Circulation* 2011;124:1973–81.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexia-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010;122: 156–63.
- Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation* 2010;122:164–72.

6. Kass DA, Kelly RP. Ventriculo-arterial coupling: concepts, assumptions, and applications. *Ann Biomed Eng* 1992;20:41-62.
7. Mercier O, Tivane A, Raoux F, et al. Reliable piglet model of chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183.
8. Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, et al. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1294-300.
9. Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM, et al. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res* 1995;29:820-6.
10. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, et al. Body surface area of female swine. *J Anim Sci* 1973;36:927-30.
11. Rondelet B, Dewachter C, Kerbaul F, et al. Prolonged overcirculation-induced pulmonary arterial hypertension as a cause of right ventricular failure. *Eur Heart J* 2011;33:1017-26.
12. de Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, et al. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H100-5.
13. Greyson CR. Pathophysiology of right ventricular failure. *Crit Care Med* 2008;36(suppl):S57-65.
14. Pawlusch DG, Musch TI, Moore RL. Ca²⁺-dependent heterometric and homeometric autoregulation in hypertrophied rat heart. *Am J Physiol* 1989;256:H1139-47.
15. Nootens M, Wolfkiel CJ, Chomka EV, et al. Understanding right and left ventricular systolic function and interactions at rest and with exercise in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1995;75:374-7.
16. Sagawa K. The end-systolic pressure-volume relation of the ventricle: definition, modifications and clinical use. *Circulation* 1981;63:1223-7.
17. Maughan WL, Shoukas AA, Sagawa K, et al. Instantaneous pressure-volume relationship of the canine right ventricle. *Circ Res* 1979;44:309-15.
18. Chantler PD, Lakatta EG, Najjar SS. Arterial-ventricular coupling: mechanistic insights into cardiovascular performance at rest and during exercise. *J Appl Physiol* 2008;105:1342-51.
19. Sanz J, Garcia-Alvarez A, Fernandez-Friera L, et al. Right ventriculo-arterial coupling in pulmonary hypertension: a magnetic resonance study. *Heart* 2012;98:238-43.
20. Hopkins WE. Right ventricular performance in congenital heart disease: a physiologic and pathophysiologic perspective. *Cardiol Clin* 2012;30:205-18.
21. Lambermont B, D'Orio V. The role of right ventricular-pulmonary arterial coupling to differentiate between effects of inotropic agents in experimental right heart failure. *Crit Care Med* 2006;34:2864-5.
22. Kuehne T, Yilmaz S, Steendijk P, et al. Magnetic resonance imaging analysis of right ventricular pressure-volume loops: in vivo validation and clinical application in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;110:2010-6.
23. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, et al. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 1997;100:2315-24.
24. Bauer EP, Kuki S, Zimmermann R, et al. Upregulated and down-regulated transcription of myocardial genes after pulmonary artery banding in pigs. *Ann Thorac Surg* 1998;66:527-31.
25. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *J Cardiol* 2001;37:110-1.
26. Mauritz GJ, Rizopoulos D, Groepenhoff H, et al. Usefulness of serial N-terminal pro-B-type natriuretic peptide measurements for determining prognosis in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol* 2011;108:1645-50.
27. Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now? *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1507-14.
28. Brookes C, Ravn H, White P, et al. Acute right ventricular dilatation in response to ischemia significantly impairs left ventricular systolic performance. *Circulation* 1999;100:761-7.
29. Trip P, Kind T, van de Veerdonk MC, et al. Accurate assessment of load-independent right ventricular systolic function in patients with pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:50-5.

5. QUATRIEME ETUDE

Soumission au Journal of Heart and Lung Transplantation, section "Research Correspondence" le 13/04/2014 (Manuscript JHLT-D-14-00250 : rejected, final decision)

**Prévention de la muscularisation des artères pulmonaires chez les rats femelles
exposées à l'hypertension pulmonaire angioproliférative**

**Muscularization of pulmonary arteries is reduced in female athymic rats exposed
to vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) blockade**

Julien Guihaire, Tobias Deuse, Elie Fadel, Sonja Schrepfer

Communication orale:

**Prévention de la muscularisation des artères pulmonaires chez les rats femelles
exposées à l'hypertension pulmonaire angioproliférative**

**Muscularization of pulmonary arteries is reduced in female athymic rats exposed
to vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) blockade**

Julien Guihaire, Elie Fadel, François Haddad, Tobias Deuse, Sonja Schrepfer

*International Society for Heart and Lung Transplantation, 34th Annual Meeting and Scientific Sessions
San Diego, USA, 11 Avril 2014*

Journal Heart Lung Transplant. 2014;33(4):S54-S55 (abstract)

Etude expérimentale réalisée dans le *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* (Pr Schrepfer)
Universitäres Herzzentrum Hamburg, Universitätsklinikum Eppendorf, Hambourg, Allemagne.

Objectifs:

Le phénotype des patients souffrant d'HTP s'est considérablement modifié au cours des dernières années. D'après les récents registres et dans la limite de leur interprétation, la prédominance féminine historique dans l'incidence de l'HTP tend à s'équilibrer.¹³⁶ Le genre masculin demeure cependant un facteur de mauvais pronostic dans cette pathologie.¹³⁷ L'influence exacte des œstrogènes sur le développement et la progression de l'HTP reste à définir. Expérimentalement, les œstrogènes ont des effets protecteurs sur la circulation pulmonaire d'après des études effectuées sur les modèles conventionnels d'HTP chronique, tels que les modèles d'hypoxie chronique et d'exposition à la monocrotaline. Nous proposons d'analyser l'influence du genre sur la sévérité de l'HTP. Nous avons employé le modèle d'HTP angioproliférative chez le rat et avons comparé le développement et la sévérité de l'HTP chez des rats mâles et femelles.

Résultats:

Parmi les 11 rats mâles exposés au semaxinib, 3 sont décédés prématurément avant le terme de l'étude (28 jours) et 3 autres ont développé d'importants épanchements pleuraux et péricardiques. L'induction expérimentale de l'HPT s'associait à une dilatation du VD associée à une dysfonction systolique à 3 semaines uniquement chez les mâles. La pression télésystolique du VD à 4 semaines était de 66 mm Hg en moyenne chez les mâles, contre 29 mm Hg chez les femelles ($P < 0.05$). Seuls les mâles exposés au semaxinib présentaient un découplage ventriculo-artériel à 4 semaines malgré une augmentation significative de Ees ($0,4 \pm 0,1$ vs. $2,1 \pm 0,3$ mm Hg/mL, $P < 0,05$). L'analyse morphométrique pulmonaire retrouvait peu de lésions intinales et l'absence de lésions plexiformes chez l'ensemble des rats. L'hypertrophie de la media était en revanche davantage marquée chez les mâles ($25,9\% \pm 4,5\%$ vs. $14,6\% \pm 2,8\%$, $P < 0,01$). De même, la surcharge chronique de pression dans le VD s'associait à une hypertrophie des cardiomyocytes chez les mâles ($273 \pm 48 \mu\text{m}^2$ vs. $168 \pm 24 \mu\text{m}^2$, $P < 0,01$).

Limites:

Les différences de remodelage pulmonaire et de sévérité hémodynamique entre les 2 genres pourraient être expliquées par les effets protecteurs des œstrogènes sur la circulation pulmonaire.

Nous n'avons pas constitué de groupe de rats femelles ovariectomisées afin de faire la part entre l'influence hormonale et une prédisposition génétique liée au genre.

Conclusions:

Dans cette observation expérimentale, les rats athymiques exposés au semaxinib développaient une HTP moins sévère que les mâles. Le rôle protecteur hypothétique des œstrogènes ne peut être démontré par ces résultats. Les effets des œstrogènes sur la vascularisation pulmonaire sont complexes et incomplètement élucidés. Le moindre remodelage de la média des artères pulmonaires chez les femelles pourrait s'expliquer par une plasticité différente des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires en réponse au semaxinib.

Manuscript Number:

Title: MUSCULARIZATION OF PULMONARY ARTERIES IS REDUCED IN FEMALE ATHYMIC RATS
EXPOSED TO VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (VEGF-R) BLOCKADE

Article Type: Research Correspondence

Corresponding Author: Dr. Julien Guihaire, M.D., M. Sc.

Corresponding Author's Institution: Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab, University Heart
Center Hamburg, Hamburg, Germany

First Author: Julien Guihaire, M.D., M. Sc.

Order of Authors: Julien Guihaire, M.D., M. Sc.; Tobias Deuse, M.D., Ph.D; Elie Fadel, M.D., Ph.D; Sonja
Schrepfer, M.D., Ph.D

ABSTRACT

Background: The epidemiology of pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by a female preponderance, whereas men share a higher severity of the disease. The influence of estrogens on the development and progression of PAH is not well documented.

Objective: To compare the severity of experimental PAH between male and female athymic rats.

Methods: PAH was induced in 11 male and 11 female athymic rats (respectively SU_M and SU_F groups) using the tyrosine kinase inhibitor of VEGF-R I and II, semaxinib (40 mg/kg, single subcutaneous injection). After 28 days, the right ventricular end-diastolic diameter (RVEDD) and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) were measured using cardiac echography and right ventricular-pulmonary arterial (RV-PA) coupling was recorded by a pressure-volume admittance catheter. Morphometric analyses of lung vasculature and right ventricular (RV) myocardium were performed using respectively elastica von Gieson and hematoxylin-eosin stainings.

Results: Four weeks after semaxinib injection, RV end-systolic pressure was higher in SU_M than in SU-F (66.3 ± 8.9 vs. 29.5 ± 13.4 mmHg, $P < 0.001$). Males developed marked RV enlargement and systolic dysfunction compared to females, considering the increase in RVEDD and the altered TAPSE (respectively 5.6 ± 0.7 vs. 2.5 ± 0.4 mm, $P < 0.001$; and 1.28 ± 0.15 vs. 2.09 ± 0.35 mm, $P < 0.001$). Similarly, females had lower medial thickening of the pulmonary arteries ($25.9\% \pm 4.5\%$ vs. 14.6% vs. 2.8% , $P < 0.001$) and less cardiomyocyte hypertrophy (273 ± 48 vs. 168 ± 24 μm^2 , $P < 0.001$).

Conclusions: Females athymic rats were protected against the development of severe PAH. Experimentally, RV-PA coupling was preserved in females through limitation of pulmonary artery muscularization. Smooth muscle cells plasticity needs to be further investigated to reverse established vascular remodeling in PAH patients.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disabling disease characterized by a higher prevalence in females.(1) Considering the independent predictors of mortality, male gender is however one of the strongest.(2) Since few men are included in clinical trials investigating PAH, there is a lack of data regarding the precise role of estrogens in the development and progression of pulmonary vascular disorders. Experimentally, estrogens exhibit protective effects on the pulmonary vasculature in classical models of pulmonary hypertension in rodents including the chronic hypoxia and monocrotaline models.(3) Gender effect on the new models of "human-like" PAH have been poorly reported. In the present study, we induced PAH in athymic nude rats to investigate the influence of gender difference on the development and severity of PAH.

METHODS

Thirty eight athymic nude rats including 19 males and 19 females were purchased. The research protocol was approved by our Institutional Committee on Animal Welfare. Experimental PAH was induced using a selective blocker of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor, semaxinib (SU5416, SUGEN Inc, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) suspended in CMC [0.5% (w/v) carboxymethylcellulose sodium, 0.9% (w/v) sodium chloride, 0.4% (v/v) polysorbate 80, 0.9% (v/v) benzyl alcohol in deionized water].(4) Eleven males (SU_M group) and 11 females (SU_F group) received a single subcutaneous injection of semaxinib (40 mg/kg), while 8 males (RNU_M group) and 8 females (RNU_F group) only received an injection of CMC vehicle. Animals received humane care in compliance with the 'Principles of Laboratory Animal Care' formulated by the National Society for Medical Research and the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 86-23, revised 1996) and were housed under normoxic conditions (Animal facilities of the University Hospital Eppendorf, Hamburg, Germany).

Cardiac echography (Vevo 2100 system, VisualSonics, Toronto, Canada) was performed 21 days after PAH induction to assess the mid right ventricular end-diastolic diameter (RVEDD) and the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE). TAPSE was measured as the maximal motion toward the apex of the lateral tricuspid annulus. A 1.2 Fr-4.5 mm electrode spacing admittance catheter (Scisense, Ontario, Canada) was introduced in the right ventricle through the apex via an open-chest approach at Day 28. Pressure-volume loops were recorded under general anesthesia (Isoflurane 2% and Buprenorphine 0.5 mg/kg) and the right ventricular (RV) end-systolic pressure-volume relationship was assessed during transient occlusion of the inferior vena cava to calculate the RV end-systolic elastance (Ees). The pulmonary arterial elastance (Ea) was defined as follows: RV end-systolic pressure/RV stroke volume. Right ventricular-pulmonary arterial (RV-PA) coupling efficiency was quantified by the Ees/Ea ratio.

Animals were recovered at Day 28 for heart and lung procurement. After one-day fixation in 4% buffer formalin solution, 5 μ m-sections were performed on paraffin-embedded tissues. Medial thickness of the pulmonary arteries (50 to 100 μ m of maximal diameter adjacent to bronchioles) was calculated as the percentage of medial layer as compared with the crosssectional diameter of the artery from one external elastic lamina to the opposed external elastic lamina (Elastica von Gieson staining, magnification x400).(5) To quantify RV hypertrophy, the crosssectional area of 20 randomized cardiomyocytes was measured in the sub-epicardial layer of the RV free wall (Hematoxylin-eosin staining, magnification x400). All variables are reported as mean value $\pm$ standard deviation. One-way analyses of variance were performed for between-group comparisons with a 95%-confidence interval using the Prism software (GraphPad, La Jolla, CA). Only animals who survived until Day 28 were included in the statistical analysis.

RESULTS

Among the 11 semaxinib-treated males, 3 died before Day 28 (on Days 21, 21 and 26) and 3 developed marked pleuropericardial effusion. All females survived until Day 28 without any thoracic effusion. Induction of experimental PAH resulted in a significant enlargement of the right ventricle after 3 weeks in males compared to females (RVEDD: 5.6 ± 0.7 vs. 2.5 ± 0.4 mm, $P < 0.01$). In addition, TAPSE was lower in the SU_M group (1.28 ± 0.15 vs. 2.09 ± 0.35 mm, $P < 0.01$). Hemodynamic parameters after 28 days are listed in Table 1. In response to semaxinib injection, athymic males showed a significant RV pressure overload during systole, with an average of 66.3 mm Hg. Increased Ea combined to altered Ees in male rats resulted in RV-PA coupling inefficiency, while ventricular-arterial coupling was preserved in the SU_F group. Morphometric analysis of the lung vasculature showed a very few rate of intimal remodeling and plexiform lesions were not remarkable among semaxinib-treated animals. Hypertrophy of the pulmonary medial layer was significantly higher in SU_M group ($25.9\% \pm 4.5\%$ vs. $14.6\% \pm 2.8\%$, $P < 0.001$). Similarly, RV pressure overload was associated with cardiomyocytes hypertrophy only in athymic males (273 ± 48 vs. 168 ± 24 μm^2 , $P < 0.001$) (Figure 1).

DISCUSSION

Athymic female rats developed less severe pulmonary hypertension in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor blockade. We hypothesize a protective role of endogenous estrogens against PAH in semaxinib-treated rats under normoxic conditions. Our findings are in accordance with previous experimental studies showing that ovariectomized rats develop more severe pulmonary hypertension in response to chronic hypoxia or to monocrotaline.(3) *In vitro*, estrogens effects on the pulmonary circulation include increase in prostacyclin release, up-regulation of the endothelial nitric oxide synthase and down-regulation of endothelin-1 expression.(6) However, the effects of steroid hormones and their analogues in PAH patients are controversial. Estrogens exhibit pro-angiogenic properties through the up-regulation of VEGF receptors. Since VEGF is a key regulator of endothelial cell survival in the lung, estrogen-therapy may lead to adverse outcomes in PAH patients.(7) Protective effects of estrogens might thus concern hyperproliferative smooth muscle cells rather than phenotypically altered endothelial cells. This is in agreement with the present results, since isolated hypertrophy of the medial layer was the hallmark of PA narrowing in our athymic rat model. For technical issues, we did not use the classical model of angioproliferative PAH which combines semaxinib to chronic hypoxia for 3 weeks. However we injected the double amount of semaxinib compared to the established model.(4) Animals were thus exposed to a strong angioproliferative stress resulting in impairment of ventricular-arterial coupling efficiency, associated with pleuropericardial effusion and sudden death in males.

Effects of estrogens on the pulmonary vasculature are complex and not clearly understood. The present study shows that female rats are experimentally protected against the development of severe PAH. The lack of major intimal damages in our model suggests that endogenous estrogens may preserve RV-PA coupling through limitation of medial thickening. Further studies are necessary to investigate the potential benefit of estrogen-therapy to reverse established pulmonary vascular remodeling in PAH patients.

Acknowledgements : The authors thank Christiane Pahrman for technical assistance and Dr. Erwan Flécher and Dr. Jean-Philippe Verhoye for final review of the manuscript.

Founding support: This study received grants from the “Fédération Française de Cardiologie” (Paris, France) and from the “Association Chirurgicale pour le Développement et l’Amélioration des Techniques de Dépistage et de Traitement des Maladies Cardio-vasculaires” (Suresnes, France).

Disclosure: No conflict of interest for the authors

TABLES

Table 1. Right heart hemodynamics at 4 weeks.

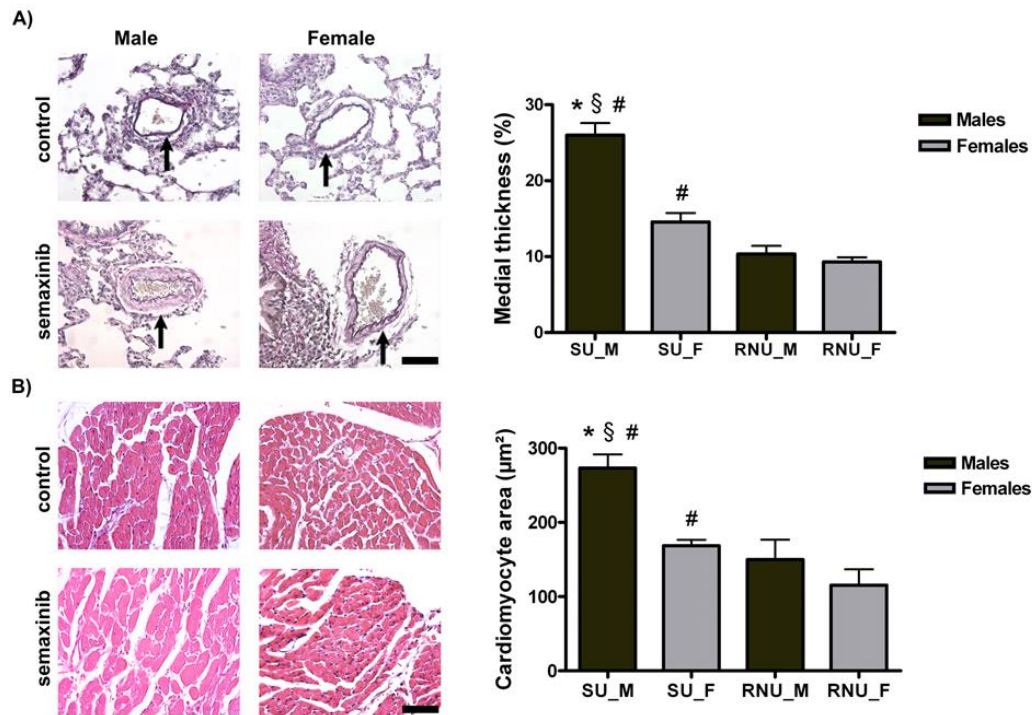
Group (n)	RNU_M (8)	RNU_F (8)	SU_M (8)	SU_F (11)
semaxinib (mg/kg)	0	0	40	40
Heart rate (bpm)	269±37	311±35	296±48	280±73
RVESP (mm Hg)	21±2.5	24.3±8.1	66.3±8.9 ^{*#§}	29.5±13.4
RVEDP (mm Hg)	1.5±3.5	3±3.6	6.2±2.8 [§]	2.1±4.3
CO (mL/min)	134±4	122±5	58±24 ^{*#§}	89±17
dP/dt max (mm Hg/s)	1173±161	1311±414	2636±495 ^{*#§}	1374±320
dP/dt min (mm Hg/s)	-1318±37	-871±232	-2370±912 ^{*#§}	-1072±415
Ees (mm Hg/μL)	0.19±0.05	0.21±0.15	0.12±0.06 ^{*#§}	0.18±0.05
Ea (mm Hg/μL)	0.04±0.01	0.06±0.03	0.33±0.12 ^{*#§}	0.09±0.02
Ees/Ea	4.75±0.63	3.5±0.45	0.36±0.17 ^{*#§}	2.1±0.34

RVESP: right ventricular end-systolic pressure; RVEDP: right ventricular end-diastolic pressure; CO: cardiac output; dP/dt max: right ventricular maximal isovolumic rate of development of ventricular pressure; dP/dt min: right ventricular minimal isovolumic rate of development of ventricular pressure. Other abbreviations are in text. * explains P<0.05 for comparison vs. SU_F; # explains P<0.05 for comparison vs. RNU_M; § explains P<0.05 for comparison vs. RNU_F.

REFERENCES

1. Shapiro S, Traiger GL, Turner M, McGoon MD, Wason P, Barst RJ: Sex differences in the diagnosis, treatment, and outcome of patients with pulmonary arterial hypertension enrolled in the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Chest* 2012;141:363-73.
2. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al.: Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010;122:156-63.
3. Tofovic SP: Estrogens and development of pulmonary hypertension: interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:696-708.
4. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, et al.: Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1280-9.
5. Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, et al.: Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003;107:1329-35.
6. Paulin R, Michelakis ED: The estrogen puzzle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2012;126:1016-9.
7. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al.: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:30336-43.

Figure 1. (A) Pulmonary artery muscularization, defined by medial thickening over 10% of the crosssectional diameter, was remarkable in male rats, while females did not develop significant medial hypertrophy in response to semaxinib injection. (B) Similarly, cardiomyocytes hypertrophy was lower among females exposed to experimental PAH. Abbreviations are in the text. * § and # explain for $P<0.05$ respectively vs. SU_F, vs. RNU_M and vs. RNU_F (one-way ANOVA). Scale bar, 25 μm .



6. CINQUIEME ETUDE

Communication affichée:

L'infiltration macrophagique est associée au remodelage inadapté du ventricule droit dans un modèle expérimental d'hypertension pulmonaire

Macrophages infiltration is associated with maladaptive remodeling of the right ventricle in an experimental model of pulmonary hypertension

Julien Guihaire, Tobias Deuse, Elie Fadel, Hermann Reichenspurner, Robert C. Robbins, Sonja Schrepfer

International Society for Heart and Lung Transplantation, 34th Annual Meeting and Scientific Sessions

San Diego, USA, 11 Avril 2014

Journal Heart Lung Transplant. 2014;33(4):S228 (abstract)

Etude expérimentale réalisée dans le *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* (Pr Schrepfer)

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Universitätsklinikum Eppendorf, Hambourg, Allemagne.

Objectifs:

L'inflammation joue un rôle majeur dans le développement et l'entretien des lésions vasculaires pulmonaires dans l'HTP chronique. A partir d'un modèle expérimental de dysfonction ventriculaire droite progressive, nous voulons démontrer le rôle des macrophages dans le remodelage myocardique. A partir du modèle d'HTP angioprolifératif chez les rats nude, nous cherchons dans un premier temps à montrer l'association entre l'infiltration macrophagique des artères pulmonaires et du myocarde ventriculaire droit, et la sévérité de la maladie chez l'animal. Il s'agit des résultats préliminaires d'une étude actuellement en cours.

Méthodes

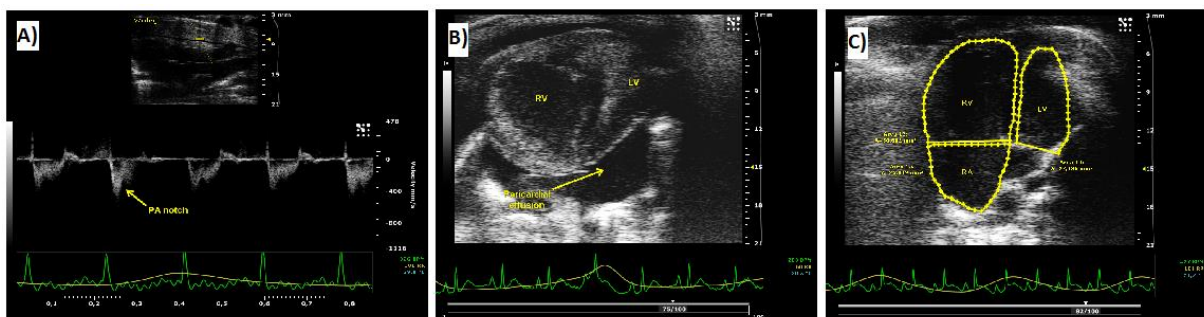
1) Protocole expérimental

Des rats nude de 6 semaines (poids moyen 160 gr) étaient répartis de manière aléatoire en 2 groupes. Le groupe SU (n=7) recevait le semaxinib (40 mg/kg) à J0 afin d'induire une HTP en 3 semaines. Le deuxième groupe recevait une injection du diluent du semaxinib, le carboxyméthylcellulose (groupe contrôle). Tous les animaux étaient gardés en conditions normoxiques et recevaient des soins et une alimentation conformes aux règles d'expérimentation animale. L'ensemble des rats était évalué par échocardiographie transthoracique à J21 (Vevo 2100, VisualSonics Inc.) afin d'apprécier le remodelage structural ainsi que le retentissement fonctionnel systolique de la surcharge de pression chronique du VD par la mesure du TAPSE et du RVFAC en fenêtre 4 cavités 2D. Une étude hémodynamique par la méthode d'admittance était réalisée à J28 (ADVantage system, Scisense) permettant l'analyse des boucles pression-volume du VD par cathétérisme cardiaque transapical à thorax ouvert (*Figure 6*). Les animaux étaient sacrifiés à J28 par exsanguination. Le bloc cœur-poumons était rapidement explanté et des prélèvements étaient pour une partie fixés dans le formol et pour le reste congelés à -80°C dans l'azote liquide. Le protocole d'étude avait été validé par le Comité de Recherche Expérimentale du Centre Universitaire UKE de Hambourg (Allemagne).

2) Etude échocardiographique

A partir d'une incidence apicale 4 cavités en mode 2D, le diamètre et la surface télédiastolique du VD étaient mesurés. Sur la même incidence, la fonction systolique du VD était appréciée par la mesure du RVFAC et du TAPSE. (Figure 10)

Figure 10. Echocardiographie d'un rat nude à 3 semaines de l'exposition au semaxinib. A) La présence d'un notch sur le signal Doppler pulmonaire était le témoin d'une hypertension pulmonaire sévère. B) En coupe petit axe, le septum interventriculaire bombait vers le ventricule gauche. Un épanchement péricardique circonférentiel était remarquable. C) En coupe 4 cavités, une mesure des surfaces cavitaires était réalisée en télédiastole. La dilatation du ventricule droit était notable dans ce cas. PA, pulmonary artery ; RV, right ventricle ; LV, left ventricle ; RA, right atrium ; pericardial effusion, épanchement péricardique.



3) Etude hémodynamique

Sous anesthésie générale (isoflurane 2% et buprénorphine 0,05 mg/kg), une trachéotomie était réalisée dans un premier temps pour permettre une ventilation assistée à pression positive durant la procédure. La méthode d'admittance à thorax ouvert était appliquée au 28^e jour. Une sonde d'admittance de 1,2 Fr était introduite dans le VD par voie transapicale. Après calibration pour le volume d'éjection systolique, pour le niveau zéro de pression ainsi que pour les caractéristiques du myocarde (sain, hypertrophié ou infarci), les boucles pression-volume du VD étaient enregistrées à l'état de base, puis au cours de 3 occlusions transitoires répétées de la veine cave inférieure. Les valeurs des 3 acquisitions successives étaient ensuite moyennées pour chaque animal.

4) Analyse morphométrique

Le bloc bi-pulmonaire était infiltré par du formol, puis bloqué en paraffine après une phase de 20 heures de déshydratation. Des coupes de 5 µm étaient ensuite réalisées, puis colorées selon le protocole Elastica van Gieson pour discriminer les limitantes élastiques des artères pulmonaires. L'épaisseur de la média était quantifiée selon la méthode de Rondelet d'après la formule préalablement citée dans la méthodologie générale¹⁰⁴:

$$\text{Epaississement media (\%)} = \text{épaisseur media} \times 2 / \text{diamètre externe}$$

De même des blocs de VD étaient produits pour analyser la morphologie du myocarde en coloration d'Hématoxyline-Eosine (x 400).

5) Analyse de l'infiltration macrophagique

A J28, les macrophages de la circulation pulmonaire étaient retrouvés autour des artères pulmonaires en immuno-histochimie avec des anticorps spécifique du marqueur CD68 de rat. En microscopie optique. La part de la circonférence vasculaire infiltrée par de Mregs était rapportée à la circonférence complète de l'artère de l'artère pulmonaire (x400). Pour le VD, une analyse de l'infiltration macrophagique était réalisée en immunofluoresce (%) et était rapportée à l'infiltration murale globale (ratio cellules CD68+/cellules totales). De même, le taux de macrophages infiltrant le myocarde du VD était évalué en immunofluorescence (x600).

Résultats

1) Résultats hémodynamiques

La pression télésystolique du VD était de 66 ± 9 mm Hg en moyenne chez les rats du groupe SU vs. 24 ± 6 mm Hg dans le groupe contrôle ($P < 0,01$).

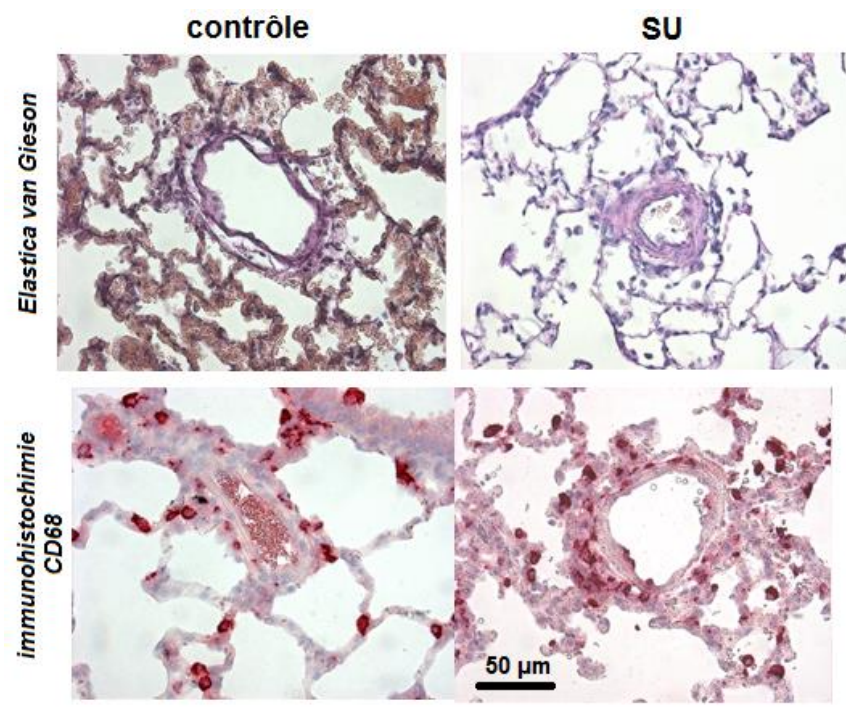
2) Résultats échocardiographiques

Les rats exposés au semaxinib présentait à 3 semaines une dilatation significative du VD caractérisée par un diamètre télédiastolique et une surface télédiastolique du VD plus élevés comparés au groupe contrôle (respectivement $5,6 \pm 0,5$ mm vs. $2,3 \pm 0,2$ mm, $P < 0,01$; $43,1 \pm 10,9$ mm² vs. $14,6 \pm 3,6$ mm², $P < 0,01$). Sur le plan fonctionnel, les animaux du groupe SU présentait une altération de la fonction systolique du VD illustrée par la diminution conjointe du RVFAC ($26\% \pm 4\%$ vs. $57\% \pm 8\%$, $P < 0,01$) et du TAPSE ($1,3 \pm 0,1$ mm vs. $2,2 \pm 0,3$ mm, $P < 0,01$).

3) Résultats morphométriques

A 4 semaines en microscopie optique, l'épaississement relatif de la média des artères pulmonaires était significativement plus élevé dans le groupe SU comparé aux animaux contrôle ($28\% \pm 2,2\%$ vs. $10,3\% \pm 2,1\%$, $P < 0,01$). Le VD était hypertrophié dans le groupe SU en réponse à la surcharge de pression chronique. En analyse macroscopique, l'indice de Fulton (poids VD/poids (VG+septum)) était ainsi de $56,4\% \pm 5,4\%$ dans le groupe SU vs. $18,2\% \pm 4,2\%$ ($P < 0,01$) (*Figure 11*).

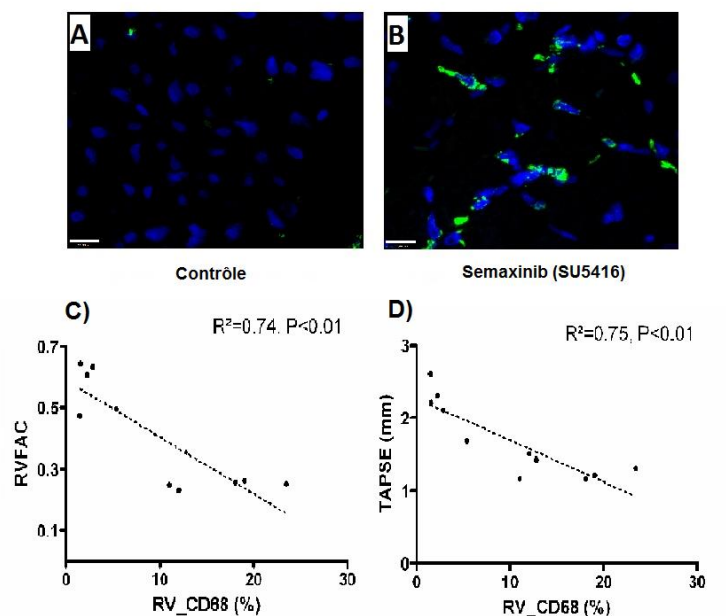
Figure 11. Morphométrie comparative des artères pulmonaires en microscopie optique à 4 semaines chez les rats nude (panel du haut, coloration Elastica van Gieson, x400). Immunohistochimie au CD68 en microscopie optique (panel du bas, x400)



4) Infiltration macrophagique

A 4 semaines en microscopie optique, nous n'avons pas observé d'anomalie au niveau de l'endothélium des AP, ni de lésions plexiformes. La paroi des AP présentait une plus forte infiltration macrophagique dans les groupes SU (respectivement $33\% \pm 3\%$ et $27\% \pm 6\%$, $P < 0,01$). De même, le myocarde du VD était infiltré par des cellules macrophagiques (CD68+) de façon plus importante chez les rats exposés à l'HTP chronique ($15\% \pm 5\%$ vs. $3\% \pm 1\%$, $P < 0,01$). En revanche aucune différence n'était observée entre les 2 groupes en immunofluorescence au niveau du VG. L'infiltration macrophagique myocardique était fortement associée à la dilatation du VD ($R^2 = 0,68$, $P < 0,01$) et à la dysfonction systolique caractérisée par l'altération du TAPSE et du RVFAC (respectivement, $R^2 = 0,75$, $P < 0,01$; et $R^2 = 0,74$, $P < 0,01$) (Figure 12).

Figure 12. Relations entre l'infiltration macrophagique du myocarde ventriculaire droit (A et B) observé en immunofluorescence (cellules CD68+ en vert ; noyaux cellulaires en bleu, DAPI) et les indices de fonction systolique du ventricule droit (C et D).



Limites:

En premier lieu il s'agit d'une observation scientifique davantage que d'une étude complète sur l'implication des macrophages dans l'atteinte cardio-pulmonaire observée dans l'HTP. Nous avons étudié les associations entre le remodelage fonctionnel du VD et la présence de macrophages dans les tissus cardiaques et pulmonaires. Le modèle animal employé est un modèle d'hypertension pulmonaire chronique « pro-inflammatoire » puisque l'on suppose que les lésions histologiques observées après l'injection du semaxinib se développent en réponse à une très forte réaction inflammatoire locale. L'infiltration macrophagique cardio-pulmonaire pourrait ainsi être liée au semaxinib lui-même et non la conséquence de l'HTP *per se*. L'absence d'infiltration macrophagique dans le VG des animaux du groupe SU n'est pas en faveur cette hypothèse. Une autre limite de cette observation est le faible effectif des animaux étudiés. Enfin le phénotype des macrophages présents dans le VD et autour des AP n'est pas documenté. Le marqueur CD68 est un marqueur ubiquitaire de la lignée macrophagique. Or les macrophages sont une population très hétérogène douée d'une plasticité cellulaire remarquable en fonction des stimuli du

microenvironnement local. Les macrophages classiquement activés, dits M1, ont ainsi des propriétés pro-inflammatoires, pro-tumorales et cytolytiques. A l'inverse, les macrophages de la voie alternative, dits M2, participent à la réparation des lésions tissulaires et ont un profil anti-tumoral. Il existe des états intermédiaires qui permettent d'influencer la différenciation des macrophages vers le phénotype M1 ou M2. Les déterminants de cette polarisation fonctionnelle sont méconnus dans l'HTP chronique.

Conclusion:

Nous avons observé expérimentalement que l'infiltration macrophagique de l'unité cardio-pulmonaire est fortement associée au remodelage inadapté du VD au cours de l'HTP chronique. Le rôle exact des macrophages dans le développement de la dysfonction ventriculaire droite reste à définir.

Macrophages infiltration is associated with maladaptive remodeling of the right ventricle in an experimental model of pulmonary hypertension

J. Guilhaire¹, T. Deuse¹, E. Fadel², H. Reichenspurner¹, R.C. Robbins³, S. Schrepfer¹
1-TSI Lab, University Heart Center Hamburg, Hamburg, Germany; 2-Thoracic and Vascular Surgery, Heart and Lung Transplantation, Marie Lannelongue Hospital, University of Paris Sud, France; 3-Cardiothoracic Surgery, Stanford University, Palo Alto, USA

Background:

Macrophages play a central role in the development of pulmonary vascular damages in pulmonary hypertension (PH). The involvement of macrophages in right ventricular (RV) remodeling related to chronic pressure overload has been poorly examined.

Methods:

Experimental PH was induced in 7 athymic rats (PH group) by single injection of the vascular endothelial growth factor receptor blocker, sumatinib (40 mg/kg). A control group including 6 athymic rats only received an injection of the sumatinib vehicle. The right ventricular fractional area change (RVFAC), the tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) and the RV end-diastolic diameter (RVEDD) were measured after 3 weeks using cardiac echography (Figure 1). After RV systolic pressure (RVSP) recording at 4 weeks, all animals were recovered for CD68 immunofluorescence staining of the RV myocardium. The ratio of CD68 positive cells to the total number of cells was calculated on 15 RV fields for each animal.

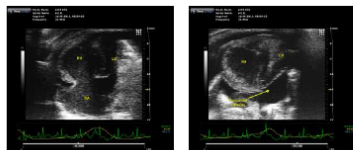


Figure 1. Echocardiography (B-mode, 4 chamber view on the left) in a PH rat at 3 weeks. Note the marked enlargement of the right ventricle (RV) and right atrium (RA), with compression of the left ventricle (LV). Pericardial effusion was remarkable in some PH rats at 3 weeks (B mode, short axis, right picture).

Results:

Sumatinib injection induced a significant increase in RVSP at 4 weeks compared to controls (66 ± 9 vs. 24 ± 6 mm Hg, $P < 0.01$). RV pressure overload was associated with a lower RVFAC (0.27 ± 0.04 vs. 0.57 ± 0.08 , $P < 0.01$) and with a higher RVEDD (5.6 ± 0.5 vs. 2.3 ± 0.2 , $P < 0.01$). The average of macrophages infiltration in the RV wall was significantly higher in the PH group ($15.2\% \pm 5.2\%$ vs. $2.6\% \pm 1.5\%$, $P < 0.01$) (Figure 2).

No disclosure

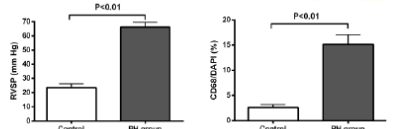
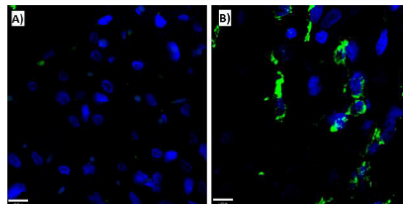


Figure 2. Comparative immunofluorescence staining for CD68 (green) in the right ventricular wall of controls (A) and PH rats (B). Magnification x600; blue=DAPI; RVSP: right ventricular systolic pressure

Macrophagic infiltration was strongly associated with RVFAC through an inverse linear relationship ($R^2 = 0.74$, $P < 0.01$). Similarly, the rate of macrophages in the RV myocardium was inversely associated with TAPSE. The elevated rate of macrophages in the myocardium was also associated with a higher degree of RV enlargement ($R^2 = 0.68$, $P < 0.01$) (Figure 3).

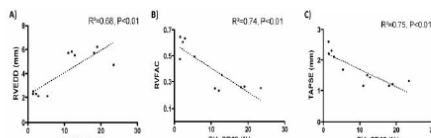


Figure 3. Relationships between macrophagic infiltration of the right ventricle (RV_CD68) and systolic function and geometry of the right ventricle in PH rats. RVEDD: right ventricular end-diastolic diameter; RVFAC: right ventricular fractional area change; TAPSE: tricuspid annular plane systolic echocardiography.

Discussion:

The main result of the present study is that macrophage infiltration is strongly associated with RV systolic dysfunction in an experimental model of chronic PH. Recent animal and human studies support growing evidence that inflammation plays a key role in heart failure pathophysiology. If neutrophils are found in RV myocardium early after acute increase of afterload, macrophages may rather be involved in RV remodeling in the setting of chronic PH. Macrophages belong to a heterogeneous cellular family with various phenotypes sharing a functional adaptability and a high sensibility to the pathological conditions of their environment. They can be involved in both tissue-destructive and tissue-reparative processes, so that all subsets of macrophages may not be detrimental. However the determinants of macrophages functional polarisation between pro-inflammatory effects and tissue homeostasis are not clearly understood.

Conclusion:

We show that myocardial infiltration by macrophages was strongly associated with RV maladaptive remodeling in a rodent model of chronic PH. The precise role of macrophages in the pathophysiology of right heart failure needs to be investigated to further elaborate a therapeutic modulation of inflammation in PH.

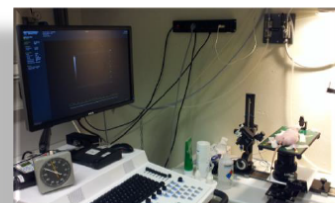


Figure 4. The small animal echo lab at the University Heart Center Hamburg.

ISHLT 34th Annual Meeting & Scientific Sessions, San Diego, USA

7. ÉTUDES EN COURS ET PERSPECTIVES :

L'IMMUNOMODULATION PAR LES MACROPHAGES REGULATEURS

a) *Plasticité fonctionnelle des macrophages*

Les macrophages sont une population hétérogène avec de nombreux variants phénotypiques partageant une adaptabilité fonctionnelle et une haute sensibilité aux conditions pathologiques de leur environnement.¹³³ Ils jouent un rôle majeur notamment dans l'inflammation et dans la défense immunitaire, et peuvent être impliqués à la fois dans les processus de destruction et de réparation tissulaires, si bien que toutes les sous-populations de macrophages ne sont pas nécessairement délétères.¹³⁴ Cependant les déterminants de cette polarisation fonctionnelle entre effets pro-inflammatoires et promotion de l'homéostasie tissulaire ne sont pas clairement compris.¹³⁵ On distingue les macrophages résidents (M0), des macrophages activés par la voie classique (M1) qui participent à la réponse immunitaire Th1, et des macrophages activés par la voie alternative (M2) qui participent plutôt à la réponse immunitaire Th2. Enfin les propriétés anti-inflammatoires médiées par le relargage de l'interleukine-10 ont été attribuées à une sous-population spécifique appelée macrophages régulateurs (M regs). Les M2 sont impliqués dans la régénération tissulaire, notamment au niveau des muscles squelettiques et probablement dans le myocarde également.^{138, 139} Ils participent notamment au remodelage de la matrice extracellulaire en favorisant l'angiogénèse et le recrutement des fibroblastes.¹³⁹ Les M regs jouent un rôle dans la polarisation du phénotype des populations macrophagiques. En conditions de stress environnemental avec présence de médiateurs et d'effecteurs pro-Th1, les M regs font plutôt orienter la différenciation des macrophages résidents et circulants vers le phénotype M2 afin de favoriser l'homéostasie tissulaire. Le *Tableau 8* résume les principales caractéristiques fonctionnelles et immunophénotypiques des populations de macrophages.

Tableau 8. Caractéristiques fonctionnelles et immunophénotypiques des principales classes de macrophages.

Macrophages	Fonction	Marqueurs
M0	Quiescents	CD11b, CD14, CD33, CD68
M1	cytotoxicité, inflammation	CD11b, CD14, CD33, CD68, IL12, IL23
M2	réparation, anti-inflammation	CD11b, CD14, CD33, CD68, CD33, CD163
Mregs	régulation vers une réponse Th2	CD11b, CD68, CD86, CMH II (HLA-DR)

b) Applications cliniques des macrophages régulateurs

D'après l'analyse des résultats des études cliniques au cours de la dernière décennie, la thérapie cellulaire régénérative à partir des cellules souches est décevante, notamment pour induire et entretenir la réparation du muscle cardiaque. Dans ce contexte, les cellules immunitaires du fait leurs propriétés humorales, représentent une alternative pour promouvoir la régénération tissulaire cardiovasculaire. Les résultats prometteurs des premiers essais cliniques de thérapie cellulaire utilisant des M regs suggèrent ainsi tout d'abord la faisabilité et la sécurité de leur génération *ex vivo*, mais également leur efficacité fonctionnelle après administration systémique pour améliorer la tolérance en transplantation rénale.^{140, 141} Hutchinson et al ont ainsi rapporté la première expérience clinique humaine des M regs. Ils ont observé qu'après une injection systémique de M regs dans la semaine précédant une transplantation rénale, les taux de rejets aigus et chroniques étaient inférieurs à ceux observés en pratique courante dans les suites de greffe.^{142, 143} Les mécanismes expliquant cette activité protectrice sont encore méconnus. Après administration systémique, les M regs pourraient influencer la réponse du receveur contre les antigènes du donneur par effet direct sur les cellules T alloréactives ou bien indirectement par relargage systémique de cytokines. A l'échelle cellulaire, les M regs pourraient profondément inhiber la prolifération des lymphocytes T.¹⁴²

c) *Macrophages régulateurs et pathologies cardiovasculaires : vers une nouvelle thérapie cellulaire dans l'hypertension pulmonaire chronique ?*

A notre connaissance, les M regs n'ont jamais été appliqués expérimentalement aussi bien comme traitement des cardiomyopathies que dans l'hypertension pulmonaire chronique. Or l'inflammation et la réponse immunitaire jouent un rôle majeur dans le remodelage et l'entretien des lésions tissulaires dans ces pathologies. L'application potentielle des M regs dans ces indications repose sur l'hypothèse que leur administration permettrait de promouvoir une réponse immunitaire réparatrice davantage que destructrice tout en inhibant l'activité des macrophages impliqués dans la réponse immune locale délétère car source de dégradation tissulaire.

Les conditions nécessaires pour une thérapie cellulaire sont bien connues à ce jour. Elle doit tout d'abord être sans danger pour le patient receveur aussi bien que pour le donneur s'il s'agit d'une thérapie hétérologue. Les cellules doivent être faciles à générer et si possible faciles à multiplier en culture. Leurs propriétés fonctionnelles doivent pouvoir être préservées aussi bien durant l'isolation cellulaire, que pendant les cultures *in vitro* et au moment de l'administration *in vivo*. Une fois injectées, les cellules doivent avoir un tropisme sélectif pour le tissu cible, d'où l'intérêt d'un suivi par marquage *in vivo*. Enfin la toxicité induite par cette thérapie cellulaire doit être la plus faible possible, notamment en termes d'induction tumorale mais également eu égard à la iatrogénie des traitements immunosuppresseurs.

Dans notre hypothèse de travail, nous souhaitons établir un protocole de thérapie cellulaire autologue à base de macrophages régulateurs générés *ex vivo*. Après isolement des cellules mononucléées, les macrophages seraient mis en culture puis stimulés afin d'induire le phénotype régulateur. A ce stade de maturité, les macrophages régulateurs seraient injectés *in vivo* pour promouvoir la réparation des lésions vasculaires pulmonaires et ainsi optimiser le couplage ventriculo-artériel. Le bénéfice fonctionnel pour le VD pourrait être indirect via la diminution des RVP, mais possiblement direct également par remodelage positif du myocarde. Nos travaux sont actuellement en cours chez le petit animal au sein du TSI Lab de Hambourg. Nous utilisons le modèle d'HTP angioprolifératif en conditions normoxiques chez les rats nus. Nous évaluons le bénéfice hémodynamique et fonctionnel pour la circulation cardiopulmonaire. Les résultats

préliminaires sont encourageants et pourraient nous permettre à moyen terme d'envisager un essai thérapeutique chez les patients souffrant d'HTP chronique.

REFERENCES

1. Champion HC, Michelakis ED and Hassoun PM. Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation*. 2009;120:992-1007.
2. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, Liou TG and McGoon MD. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010;122:164-72.
3. Hoeper MM, Mayer E, Simonneau G and Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;113:2011-20.
4. W. H. Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus. 1628.
5. Starr I. JW, Meade RH. . The absence of conspicuous increments of venous pressure after severe damage to the RV of the dog, with the discussion with the relation between clinical congestive heart failure and heart disease. *Am Heart J*. 1943;26:291-301.
6. Kagan A. Dynamic responses of the right ventricle following extensive damage by cauterization. *Circulation*. 1952;5:816-23.
7. Fontan F and Baudet E. Surgical repair of tricuspid atresia. *Thorax*. 1971;26:240-8.
8. Fontan F, Kirklin JW, Fernandez G, Costa F, Naftel DC, Tritto F and Blackstone EH. Outcome after a "perfect" Fontan operation. *Circulation*. 1990;81:1520-36.
9. van Wolferen SA, Marcus JT, Boonstra A, Marques KM, Bronzwaer JG, Spreeuwenberg MD, Postmus PE and Vonk-Noordegraaf A. Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European heart journal*. 2007;28:1250-7.
10. Sanchez MAT, A. Foreward: right ventricular function and pulmonary hypertension. *Eur Heart Journal Supplements*. 2007:H(H3-H4).
11. Haddad F, Hunt SA, Rosenthal DN and Murphy DJ. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation*. 2008;117:1436-48.
12. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ and Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117:1717-31.
13. Dell'Italia LJ. The right ventricle: anatomy, physiology, and clinical importance. *Curr Probl Cardiol*. 1991;16:653-720.
14. Kaul TK and Fields BL. Postoperative acute refractory right ventricular failure: incidence,

- pathogenesis, management and prognosis. *Cardiovascular surgery (London, England)*. 2000;8:1-9.
15. Haddad F, Couture P, Tousignant C and Denault AY. The right ventricle in cardiac surgery, a perioperative perspective: II. Pathophysiology, clinical importance, and management. *Anesthesia and analgesia*. 2009;108:422-33.
 16. Brickner ME, Hillis LD and Lange RA. Congenital heart disease in adults. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;342:256-63.
 17. Brickner ME, Hillis LD and Lange RA. Congenital heart disease in adults. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2000;342:334-42.
 18. Guihaire J, Haddad F, Mercier O, Murphy DJ, Wu JC and Fadel E. The Right Heart in Congenital Heart Disease, Mechanisms and Recent Advances. *Journal of clinical & experimental cardiology*. 2012;8:1-11.
 19. Dang NC, Topkara VK, Mercado M, Kay J, Kruger KH, Aboodi MS, Oz MC and Naka Y. Right heart failure after left ventricular assist device implantation in patients with chronic congestive heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2006;25:1-6.
 20. Matthews JC, Koelling TM, Pagani FD and Aaronson KD. The right ventricular failure risk score a pre-operative tool for assessing the risk of right ventricular failure in left ventricular assist device candidates. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:2163-72.
 21. Vonk-Noordegraaf A and Souza R. Cardiac magnetic resonance imaging: what can it add to our knowledge of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension? *Am J Cardiol*. 2012;110:25s-31s.
 22. Handoko ML, de Man FS, Allaart CP, Paulus WJ, Westerhof N and Vonk-Noordegraaf A. Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: lessons from the left heart. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2010;19:72-82.
 23. Ryan JJ and Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ Res*. 2014;115:176-88.
 24. Viragh S and Challice CE. Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse. *Journal of ultrastructure research*. 1973;42:1-24.
 25. Kelly RG, Brown NA and Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Developmental cell*. 2001;1:435-40.
 26. Kelly RG. Building the right ventricle. *Circ Res*. 2007;100:943-5.
 27. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D and Markwald RR. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Developmental biology*. 2001;238:97-109.

28. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME and Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res*. 2004;95:261-8.
29. Ho SY and Nihoyannopoulos P. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart*. 2006;92 Suppl 1:i2-13.
30. Brittain EL, Hemnes AR, Keebler M, Lawson M, Byrd BF, 3rd and Disalvo T. Right ventricular plasticity and functional imaging. *Pulmonary circulation*. 2012;2:309-26.
31. Rain S, Handoko ML, Trip P, Gan CT, Westerhof N, Stienen GJ, Paulus WJ, Ottenheim CA, Marcus JT, Dorfmueller P, Guignabert C, Humbert M, Macdonald P, Dos Remedios C, Postmus PE, Saripalli C, Hidalgo CG, Granzier HL, Vonk-Noordegraaf A, van der Velden J and de Man FS. Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2013;128:2016-25, 1-10.
32. Brown SB, Raina A, Katz D, Szerlip M, Wiegers SE and Forfia PR. Longitudinal shortening accounts for the majority of right ventricular contraction and improves after pulmonary vasodilator therapy in normal subjects and patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2011;140:27-33.
33. Santamore WP and Dell'Italia LJ. Ventricular interdependence: significant left ventricular contributions to right ventricular systolic function. *Prog Cardiovasc Dis*. 1998;40:289-308.
34. Taylor RR, Covell JW, Sonnenblick EH and Ross J, Jr. Dependence of ventricular distensibility on filling of the opposite ventricle. *Am J Physiol*. 1967;213:711-8.
35. Greyson CR. Pathophysiology of right ventricular failure. *Crit Care Med*. 2008;36:S57-65.
36. Bishop VS and Horwitz LD. Quantitative assessment of cardiac pump performance. *J Physiol*. 1977;269:355-70.
37. Naeije R and Dedobbeleer C. Pulmonary hypertension and the right ventricle in hypoxia. *Experimental physiology*. 2013;98:1247-56.
38. Dyke CM, Brunsting LA, Salter DR, Murphy CE, Abd-Elfattah A and Wechsler AS. Preload dependence of right ventricular blood flow: I. The normal right ventricle. *Ann Thorac Surg*. 1987;43:478-83.
39. Brooks H, Kirk ES, Vokonas PS, Urschel CW and Sonnenblick EH. Performance of the right ventricle under stress: relation to right coronary flow. *J Clin Invest*. 1971;50:2176-83.
40. Grignola JC, Gines F, Bia D and Armentano R. Improved right ventricular-vascular coupling during active pulmonary hypertension. *Int J Cardiol*. 2007;115:171-82.
41. Hunter KS, Lee P-F, Lanning CJ, Ivy DD, Kirby KS, Claussen LR, Chan KC and Shandas R. Pulmonary vascular input impedance is a combined measure of pulmonary vascular resistance and stiffness and predicts clinical outcomes better than pulmonary vascular resistance alone in pediatric patients with pulmonary hypertension. *American Heart Journal*. 2008;155:166-174.

42. Chesler NC, Roldan A, Vanderpool RR and Naeije R. How to measure pulmonary vascular and right ventricular function. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:177-80.
43. Sunagawa K, Maughan WL and Sagawa K. Optimal arterial resistance for the maximal stroke work studied in isolated canine left ventricle. *Circ Res.* 1985;56:586-95.
44. Morimont P, Lambermont B, Ghuysen A, Gerard P, Kolh P, Lancellotti P, Tchana-Sato V, Desai T and D'Orio V. Effective arterial elastance as an index of pulmonary vascular load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294:H2736-42.
45. Castelain V, Herve P, Lecarpentier Y, Duroux P, Simonneau G and Chemla D. Pulmonary artery pulse pressure and wave reflection in chronic pulmonary thromboembolism and primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37:1085-92.
46. Saouti N, Westerhof N, Postmus PE and Vonk-Noordegraaf A. The arterial load in pulmonary hypertension. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society.* 2010;19:197-203.
47. Sunagawa K and Sagawa K. Models of ventricular contraction based on time-varying elastance. *Crit Rev Biomed Eng.* 1982;7:193-228.
48. Morimont P, LB, Ghuysen A., Gerard P., Kolh P., D'Orio V. Le couplage ventriculo-artériel: du concept aux applications cliniques. *Réanimation.* 2009:201-206.
49. Glower DD, Spratt JA, Snow ND, Kabas JS, Davis JW, Olsen CO, Tyson GS, Sabiston DC, Jr. and Rankin JS. Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation.* 1985;71:994-1009.
50. Ghuysen A, Lambermont B, Dogne JM, Kolh P, Tchana-Sato V, Morimont P, Magis D, Hanson J, Segers P and D'Orio V. Effect of BM-573 [N-terbutyl-N'-[2-(4'-methylphenylamino)-5-nitro-benzenesulfonyl]urea], a dual thromboxane synthase inhibitor and thromboxane receptor antagonist, in a porcine model of acute pulmonary embolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2004;310:964-72.
51. Kolh P, Lambermont B, Ghuysen A, D'Orio V, Gerard P, Morimont P, Tchana-Sato V, Pierard L, Dogne JM and Limet R. Alteration of left ventriculo-arterial coupling and mechanical efficiency during acute myocardial ischemia. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology.* 2003;22:148-58.
52. Lambermont B, Kolh P, Ghuysen A, Segers P, Dogne JM, Tchana-Sato V, Morimont P, Benoit P, Gerard P, Masereel B and D'Orio V. Effect of a novel thromboxane A2 inhibitor on right ventricular-arterial coupling in endotoxic shock. *Shock (Augusta, Ga).* 2004;21:45-51.
53. Takeuchi M, Igarashi Y, Tomimoto S, Odake M, Hayashi T, Tsukamoto T, Hata K, Takaoka H and Fukuzaki H. Single-beat estimation of the slope of the end-systolic pressure-volume relation in the human left ventricle. *Circulation.* 1991;83:202-12.

54. Brimiouille S, Wauthy P, Ewalenko P, Rondelet B, Vermeulen F, Kerbaul F and Naeije R. Single-beat estimation of right ventricular end-systolic pressure-volume relationship. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1625-30.
55. Dell'Italia LJ and Walsh RA. Application of a time varying elastance model to right ventricular performance in man. *Cardiovasc Res*. 1988;22:864-74.
56. Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A and Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135:794-804.
57. Altin SE and Schulze PC. Metabolism of the right ventricle and the response to hypertrophy and failure. *Progress in cardiovascular diseases*. 2012;55:229-233.
58. Randle PJ, Garland PB, Hales CN and Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963;1:785-9.
59. Guihaire J, Bogaard HJ, Flecher E, Noly PE, Mercier O, Haddad F and Fadel E. Experimental models of right heart failure: a window for translational research in pulmonary hypertension. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2013;34:689-99.
60. Marino TA, Kent RL, Uboh CE, Fernandez E, Thompson EW and Cooper Gt. Structural analysis of pressure versus volume overload hypertrophy of cat right ventricle. *Am J Physiol*. 1985;249:H371-9.
61. Kasimir MT, Seebacher G, Jaksch P, Winkler G, Schmid K, Marta GM, Simon P and Klepetko W. Reverse cardiac remodelling in patients with primary pulmonary hypertension after isolated lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;26:776-81.
62. Klotz S, Naka Y, Oz MC and Burkhoff D. Biventricular assist device-induced right ventricular reverse structural and functional remodeling. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24:1195-201.
63. Kret M and Arora R. Pathophysiological basis of right ventricular remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2007;12:5-14.
64. Watts JA, Marchick MR and Kline JA. Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension. *Journal of cardiac failure*. 2010;16:250-9.
65. Watts JA, Marchick MR and Kline JA. Right Ventricular Heart Failure From Pulmonary Embolism: Key Distinctions From Chronic Pulmonary Hypertension. *Journal of cardiac failure*. 2010;16:250-259.
66. Rondelet B, Dewachter C, Kerbaul F, Kang X, Fesler P, Brimiouille S, Naeije R and Dewachter L. Prolonged overcirculation-induced pulmonary arterial hypertension as a cause of right ventricular failure. *European heart journal*. 2012;33:1017-26.

67. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM and Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997;100:2315-24.
68. Lambert V, Capderou A, Le Bret E, Rucker-Martin C, Deroubaix E, Gouadon E, Raymond N, Stos B, Serraf A and Renaud JF. Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart disease: an experimental model for therapeutic innovation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2010;139:1197-204, 1204 e1.
69. Bishop JE, Rhodes S, Laurent GJ, Low RB and Stirewalt WS. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1581-5.
70. Lamberts RR, Caldenhoven E, Lansink M, Witte G, Vaessen RJ, St Cyr JA and Stienen GJ. Preservation of diastolic function in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1869-76.
71. Rain S, Handoko ML, Vonk Noordegraaf A, Bogaard HJ, van der Velden J and de Man FS. Pressure-overload-induced right heart failure. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2014.
72. Pela G, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano PF and Visioli O. Beta 1- and beta 2-receptors are differentially desensitized in an experimental model of heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16:839-46.
73. Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Larrabee P, Skerl L, Klein JW, Anderson FL, Murray J, Mestroni L, Karwande SV and et al. Beta-adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms. *J Clin Invest.* 1992;89:803-15.
74. Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, Port JD, Rasmussen R, Ray PE and Feldman AM. Reduced beta 1 receptor messenger RNA abundance in the failing human heart. *J Clin Invest.* 1993;92:2737-45.
75. Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN and Voelkel NF. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:652-60.
76. de Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruiter G, Francois C, Schalij I, Dorfmueller P, Simonneau G, Fadel E, Perros F, Boonstra A, Postmus PE, van der Velden J, Vonk-Noordegraaf A, Humbert M, Eddahibi S and Guignabert C. Dysregulated Renin-Angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:780-9.

77. Rouleau JL, Kapuku G, Pelletier S, Gosselin H, Adam A, Gagnon C, Lambert C and Meloche S. Cardioprotective effects of ramipril and losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit: importance of kinins and influence on angiotensin II type 1 receptor signaling pathway. *Circulation*. 2001;104:939-44.
78. Yoshiyama M, Takeuchi K, Hanatani A, Shimada T, Takemoto Y, Shimizu N, Omura T, Kim S, Iwao H and Yoshikawa J. Effect of cilazapril on ventricular remodeling assessed by Doppler-echocardiographic assessment and cardiac gene expression. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1998;12:57-70.
79. Ahn BH, Park HK, Cho HG, Lee HA, Lee YM, Yang EK and Lee WJ. Estrogen and enalapril attenuate the development of right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline in ovariectomized rats. *J Korean Med Sci*. 2003;18:641-8.
80. Bolger AP, Sharma R, Li W, Leenarts M, Kalra PR, Kemp M, Coats AJ, Anker SD and Gatzoulis MA. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circulation*. 2002;106:92-9.
81. Fan TH, Liang CS, Kawashima S and Banerjee SP. Alterations in cardiac beta-adrenoceptor responsiveness and adenylate cyclase system by congestive heart failure in dogs. *European journal of pharmacology*. 1987;140:123-32.
82. Tudor RM, Davis LA and Graham BB. Targeting energetic metabolism: a new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:260-6.
83. Piao L, Fang YH, Cadete VJ, Wietholt C, Urboniene D, Toth PT, Marsboom G, Zhang HJ, Haber I, Rehman J, Lopaschuk GD and Archer SL. The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *Journal of molecular medicine*. 2010;88:47-60.
84. Wrigley BJ, Lip GY and Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *European journal of heart failure*. 2011;13:1161-71.
85. Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr., Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG and Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- α promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998;97:1382-91.
86. Watts JA, Gellar MA, Stuart LK, Obratzsova M and Kline JA. Proinflammatory events in right ventricular damage during pulmonary embolism: effects of treatment with ketorolac in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54:246-52.
87. El Chami H and Hassoun PM. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;55:218-28.

88. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX and Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S10-9.
89. Dorfmüller P, Humbert M, Perros F, Sanchez O, Simonneau G, Müller KM and Capron F. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Human pathology*. 2007;38:893-902.
90. Huertas A, Perros F, Tu L, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Dorfmüller P, Guignabert C and Humbert M. Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation*. 2014;129:1332-40.
91. Cohen-Kaminsky S, Hautefort A, Price L, Humbert M and Perros F. Inflammation in pulmonary hypertension: what we know and what we could logically and safely target first. *Drug discovery today*. 2014.
92. Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M and Nicolls MR. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 2014;115:165-75.
93. Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, Ockaili R, McCord JM and Voelkel NF. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation*. 2009;120:1951-60.
94. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297:L1013-32.
95. Kay JM, Keane PM, Suyama KL and Gauthier D. Angiotensin converting enzyme activity and evolution of pulmonary vascular disease in rats with monocrotaline pulmonary hypertension. *Thorax*. 1982;37:88-96.
96. Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI and van der Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H2424-30.
97. Umar S, de Visser YP, Steendijk P, Schutte CI, Laghmani el H, Wagenaar GT, Bax WH, Mantikou E, Pijnappels DA, Atsma DE, Schalijs MJ, van der Wall EE and van der Laarse A. Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1606-16.
98. Tada Y, Laudi S, Haral J, Carr M, Ivester C, Tanabe N, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Nichols WC and West J. Murine pulmonary response to chronic hypoxia is strain specific. *Exp Lung Res*. 2008;34:313-23.
99. Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, Voelkel NF, Henson J, Tucker A, Wilson H and Reeves

- JT. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J Appl Physiol*. 1987;62:821-30.
100. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, Scerbavicius R, Burns N, Cool C, Wood K, Parr JE, Boackle SA and Voelkel NF. Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:1280-9.
101. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF and Tudor RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001;15:427-38.
102. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF and Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;121:2747-54.
103. Thompson JT, Rackley MS and O'Brien TX. Upregulation of the cardiac homeobox gene Nkx2-5 (CSX) in feline right ventricular pressure overload. *Am J Physiol*. 1998;274:H1569-73.
104. Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rummelink M, Brimiouille S, McEntee K, Wauthy P, Salmon I, Ketelslegers JM and Naeije R. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2003;107:1329-35.
105. Basquin A, Pineau E, Galmiche L, Bonnet D, Sidi D and Boudjemline Y. Transcatheter valve insertion in a model of enlarged right ventricular outflow tracts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2010;139:198-208.
106. Guihaire J, Haddad F, Mercier O, Boulate D, Decante B, Herve P, Darteville P, Humbert M and Fadel E. Indices of Right Ventricular Contractility in a Model of Chronic Pulmonary Hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2013;32:S78.
107. Kerbaul F, Gariboldi V, Giorgi R, Mekkaoui C, Guieu R, Fesler P, Gouin F, Brimiouille S and Collart F. Effects of levosimendan on acute pulmonary embolism-induced right ventricular failure. *Crit Care Med*. 2007;35:1948-54.
108. de Vroomen M, Cardozo RH, Steendijk P, van Bel F and Baan J. Improved contractile performance of right ventricle in response to increased RV afterload in newborn lamb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H100-5.
109. West J, Fagan K, Steudel W, Fouty B, Lane K, Harral J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Ozimek J, Tudor R and Rodman DM. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res*. 2004;94:1109-14.
110. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK and Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia

inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006;113:2630-41.

111. Guihaire J, Haddad F, Mercier O, Boulate D, Decante B, Flecher E, Darteville P and Fadel E. 213 The Relationship between Right Ventricular Pulmonary Arterial Coupling and Right Ventricular Structure and Function in a Porcine Model of Pulmonary Hypertension. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2012;31:S79.

112. Nagendran J, Gurtu V, Fu DZ, Dyck JRB, Haromy A, Ross DB, Rebeyka IM and Michelakis ED. A dynamic and chamber-specific mitochondrial remodeling in right ventricular hypertrophy can be therapeutically targeted. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2008;136:168-178.e3.

113. Boulate D, Guihaire J, Dorfmueller P, Decante B, Darteville P, Fadel E and Mercier O. Pulmonary Arterial Bed Reperfusion Induces Regression of Distal Vasculopathy in a Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Piglet Model. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2013;32:S305.

114. Guihaire J, Haddad F, Boulate D, Capderou A, Decante B, Flecher E, Eddahibi S, Dorfmueller P, Herve P, Humbert M, Verhoye JP, Darteville P, Mercier O and Fadel E. Right ventricular plasticity in a porcine model of chronic pressure overload. *J Heart Lung Transplant*. 2014;33:194-202.

115. Sukbuntherng J, Cropp G, Hannah A, Wagner GS, Shawver LK and Antonian L. Pharmacokinetics and interspecies scaling of a novel VEGF receptor inhibitor, SU5416. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53:1629-36.

116. Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, Farkas L, Drake JI, Al Hussein A, Gomez-Arroyo JG, Voelkel NF and Bogaard HJ. New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulmonary circulation*. 2012;2:434-42.

117. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ and Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2012;40:1555-65.

118. Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, Wang L, Sung YK, Gera L, Patterson AJ, Agrawal R, Rabinovitch M, Ambler K, Long CS, Voelkel NF and Nicolls MR. Regulatory T Cells Limit Vascular Endothelial Injury and Prevent Pulmonary Hypertension. *Circulation Research*. 2011;109:867-879.

119. Mauritz GJ, Kind T, Marcus JT, Bogaard HJ, van de Veerdonk M, Postmus PE, Boonstra A,

- Westerhof N and Vonk-Noordegraaf A. Progressive changes in right ventricular geometric shortening and long-term survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141:935-43.
120. Cheung MM, Smallhorn JF, Redington AN and Vogel M. The effects of changes in loading conditions and modulation of inotropic state on the myocardial performance index: comparison with conductance catheter measurements. *European heart journal*. 2004;25:2238-42.
121. Vogel M, Derrick G, White PA, Cullen S, Aichner H, Deanfield J and Redington AN. Systemic ventricular function in patients with transposition of the great arteries after atrial repair: a tissue Doppler and conductance catheter study. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:100-6.
122. Vogel M, Schmidt MR, Kristiansen SB, Cheung M, White PA, Sorensen K and Redington AN. Validation of myocardial acceleration during isovolumic contraction as a novel noninvasive index of right ventricular contractility: comparison with ventricular pressure-volume relations in an animal model. *Circulation*. 2002;105:1693-9.
123. Vogel M, Sponring J, Cullen S, Deanfield JE and Redington AN. Regional wall motion and abnormalities of electrical depolarization and repolarization in patients after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Circulation*. 2001;103:1669-73.
124. Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, Baudet B, Detruit H, de Montpreville V, Libert JM, Wartski M, Herve P and Darteville P. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1294-300.
125. Fadel E, Riou JY, Mazmanian M, Brenot P, Dulmet E, Detruit H, Serraf A, Bacha EA, Herve P and Darteville P. Pulmonary thromboendarterectomy for chronic thromboembolic obstruction of the pulmonary artery in piglets. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1999;117:787-93.
126. Dickstein ML, Yano O, Spotnitz HM and Burkhoff D. Assessment of right ventricular contractile state with the conductance catheter technique in the pig. *Cardiovasc Res*. 1995;29:820-6.
127. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, Torbicki A, Voelkel NF and Hassoun PM. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D22-33.
128. Bossone E, D'Andrea A, D'Alto M, Citro R, Argiento P, Ferrara F, Cittadini A, Rubenfire M and Naeije R. Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2013;26:1-14.
129. Grunig E, Tiede H, Enyimayew EO, Ehlken N, Seyfarth HJ, Bossone E, D'Andrea A, Naeije R, Olschewski H, Ulrich S, Nagel C, Halank M and Fischer C. Assessment and prognostic relevance of right ventricular contractile reserve in patients with severe pulmonary hypertension.

Circulation. 2013;128:2005-15.

130. Naeije R and Chesler N. Pulmonary circulation at exercise. *Comprehensive Physiology*. 2012;2:711-41.

131. Vonk-Noordegraaf A and Westerhof N. Describing right ventricular function. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2013;41:1419-23.

132. Keogh AM, Mayer E, Benza RL, Corris P, Darteville PG, Frost AE, Kim NH, Lang IM, Pepke-Zaba J and Sandoval J. Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S67-77.

133. Weidenbusch M and Anders HJ. Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis. *J Innate Immun*. 2012;4:463-77.

134. Anders HJ and Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int*. 2011;80:915-25.

135. Brancato SK and Albina JE. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol*. 2011;178:19-25.

136. McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Pulido T, Rich S, Rosenkranz S, Suissa S and Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D51-9.

137. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza R and Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122:156-63.

138. Broichhausen C, Riquelme P, Geissler EK and Hutchinson JA. Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012;17:332-42.

139. Santini MP and Rosenthal N. Myocardial regenerative properties of macrophage populations and stem cells. *Journal of cardiovascular translational research*. 2012;5:700-12.

140. Hutchinson JA, Brem-Exner BG, Riquelme P, Roelen D, Schulze M, Ivens K, Grabensee B, Witzke O, Philipp T, Renders L, Humpe A, Sotnikova A, Matthai M, Heumann A, Govert F, Schulte T, Kabelitz D, Claas FH, Geissler EK, Kunzendorf U and Fandrich F. A cell-based approach to the minimization of immunosuppression in renal transplantation. *Transpl Int*. 2008;21:742-54.

141. Hutchinson JA, Riquelme P, Brem-Exner BG, Schulze M, Matthai M, Renders L, Kunzendorf U, Geissler EK and Fandrich F. Transplant acceptance-inducing cells as an immune-

conditioning therapy in renal transplantation. *Transpl Int*. 2008;21:728-41.

142. Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu P, Zuhayra M, Oberg HH, Pascher A, Lutzen U, Janssen U, Broichhausen C, Renders L, Thaïss F, Scheuermann E, Henze E, Volk HD, Chatenoud L, Lechler RI, Wood KJ, Kabelitz D, Schlitt HJ, Geissler EK and Fandrich F. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol*. 2011;187:2072-8.

143. Hutchinson JA, Riquelme P, Geissler EK and Fandrich F. Human regulatory macrophages. *Methods Mol Biol*. 2011;677:181-92.

Remodelage du Ventricule Droit dans l'Hypertension Pulmonaire Chronique Expérimentale

Julien Guihaire

◆ Résumé de la thèse :

La survie des patients souffrant d'hypertension pulmonaire chronique est conditionnée par le remodelage du ventricule droit et sa capacité d'adaptation face à l'élévation de sa post-charge. A partir de modèles expérimentaux de surcharge de pression chronique, nous avons étudié le couplage ventriculo-artériel et ses relations aux indices usuels de fonction ventriculaire droite, mais également à la morphométrie et à l'expression génique dans le ventricule droit. Nous avons observé que la réserve fonctionnelle du ventricule droit est fortement associée au degré de couplage entre le ventricule droit et la circulation pulmonaire d'aval.

◆ Mots clés :

hypertension pulmonaire chronique ; physiopathologie ; modèle expérimentaux ; couplage ventriculo-artériel ; morphométrie

◆ Laboratoire de rattachement :

Laboratoire de Recherche Chirurgicale et Inserm U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue,
Université Paris Sud, Le Plessis Robinson

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex