

# Mise au point et validation du modèle d'hypertension pulmonaire post-embolique chez le porc

## Piglet model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

O Mercier

Laboratoire de recherche chirurgicale, Centre chirurgical Marie Lannelongue, INSERM U999, Université Paris-Sud

### Mots clés

- ◆ Hypertension pulmonaire
- ◆ Hypertension pulmonaire post-embolique
- ◆ Modèle animal

### Résumé

**Objectif.** L'hypertension pulmonaire post-embolique (HP-PE) est une maladie fatale liée à une obstruction vasculaire pulmonaire par des caillots organisés et à une vasculopathie pulmonaire distale dans les territoires non obstrués. En conséquence, une dysfonction du ventricule droit s'installe progressivement jusqu'à la défaillance complète. La physiopathologie précise de cette maladie reste à ce jour inconnue. Le but de cette étude est de mettre au point et de valider le modèle d'HP-PE chez le cochon afin de pouvoir étudier dans un second temps sa physiopathologie.

**Matériels et méthodes.** L'HP-PE était induite par une ligature première de l'artère pulmonaire gauche par sternotomie médiane suivie de séances hebdomadaires d'embolisation pulmonaire d'histoacryl sous contrôle scopique pendant quatre semaines. Le groupe HP-PE (n=5) était comparé à un groupe témoin (n=5). Les données morphologiques, hémodynamiques, morphométriques, fonctionnelles ont été étudiées.

**Résultats.** Comparés aux animaux témoins, les animaux HP-PE avaient une pression artérielle pulmonaire moyenne (28.5±1.7 mmHg vs. 11.6±1.8 mmHg, p=0.0001) et des résistances pulmonaires totales plus importantes (9.8±2 UW vs. 5.5±1 UW, p=0.05). L'échographie cardiaque montrait un ventricule droit dilaté, une paroi libre du ventricule droit épaissie (56±5 mm vs. 30±4 mm, p=0.0003), un TAPSE diminué (11.3±0.9 mm vs. 14.4±0.4 mm, p=0.01) et un mouvement paradoxal du septum interventriculaire. L'étude morphométrique concluait à une hypervascularisation bronchique (n artère bronchique/bronche = 8.7±0.9 vs. 2±0.17 p<0.0001) et un épaississement de la media des artérioles pulmonaires (60 %±2.8 vs. 29 %±0.9 p<0.0001) dans les zones obstruées en relation avec une vasculopathie postobstructive. Dans les territoires non-obstrués, seul un épaississement de la media des artérioles pulmonaires était retrouvé (70 %±2.4 vs. 29 %±0.9, p<0.0001).

**Conclusion.** Pour la première fois, nous avons développé un modèle animal fiable et reproductible d'hypertension pulmonaire post-embolique regroupant tous les critères de cette maladie : une pression artérielle pulmonaire moyenne et des résistances pulmonaires totales élevées, une hypervascularisation bronchique, une vasculopathie pulmonaire distale et une dysfonction ventriculaire droite.

### Keywords

- ◆ Chronic thromboembolic pulmonary hypertension
- ◆ Pulmonary hypertension
- ◆ Animal model

### Abstract

**Objectives.** Chronic thrombo-embolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a fatal disease due to a partial obstruction of the pulmonary arterial bed by unresolved and organized clots associated with a vasculopathy in the non-obstructed pulmonary territories leading to an increase of pulmonary vascular resistances. As a consequence, right ventricle (RV) dysfunction develops progressively. So far, no animal model accurately reproduces all the aspects of this disease. The aim of this study was to develop a reliable animal model of CTEPH.

**Methods.** CTEPH was induced in piglet by ligation of the left pulmonary artery (PA) through a midline sternotomy followed by a weekly embolization of the right lower lobe arteries by tissue adhesive under fluoroscopic control for 5 weeks. This CTEPH group (n=5) was compared to Sham operated animals (n=5). Hemodynamics, right ventricle function on echocardiography and lung morphometry were assessed at 5 weeks.

**Results.** Compared to sham, CTEPH animals had increased mean PA pressure (28.5±1.7 mmHg vs. 11.6±1.8 mmHg, p=0.0001) and pulmonary resistances (9.8±2 WU vs. 5.5±1 WU, p=0.05). On echocardiography, they had enlarged right ventricle, increased right ventricle wall thickness (56±5 mm vs. 30±4 mm, p=0.0003), decreased TAPSE (11.3±0.9 mm vs. 14.4±0.4 mm, p=0.01) and a paradoxical septal motion. Morphometric studies demonstrated in the obstructed territories an increase of the number of bronchial arteries per bronchus (8.7±0.9 vs. 2±0.17 p<0.0001) and of distal PA media thickness (60 %±2.8 vs. 29 %±0.9 p<0.0001) consistent with a post-obstructive vasculopathy. In the non-obstructed territories, an increase of distal PA media thickness was found (70 %±2.4 vs. 29 %±0.9, p<0.0001).

**Conclusions.** For the first time, we developed a reliable piglet model of CTEPH reproducing all the aspects of this disease : increased mean PA pressure and pulmonary resistances, increased bronchial circulation, pulmonary vasculopathy and RV dysfunction.

### Correspondance :

Olaf Mercier, Service de chirurgie thoracique et vasculaire et transplantation cardio-pulmonaire  
Centre chirurgical Marie Lannelongue, 133, avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson  
E-mail : o.mercier@ccml.fr

Une des raisons du manque de connaissances physiopathologiques de l'hypertension pulmonaire post-embolique (HP-PE) est l'absence à ce jour de modèle animal validé de la maladie. Il s'agit d'une maladie chronique s'installant progressivement dans le temps associant une maladie pulmonaire complexe ayant un retentissement cardiaque, cause du décès. Le territoire pulmonaire obstrué et sa reperfusion ont été modélisés et étudiés dans notre laboratoire (1-3), mettant en évidence la vasculopathie post-obstructive, l'hypervascularisation bronchique secondaire à l'ischémie pulmonaire chronique, et démontrant que l'œdème postopératoire de la TEP, uniquement présent dans les zones désobstruées, était un œdème de reperfusion.

Dans les deux premières études, nous avons modélisé et étudié le territoire pulmonaire non obstrué de l'HP-PE. L'hyperdébit chronique induit des lésions microvasculaires à type d'épaississement de la media artérielle. L'ET-1 et son récepteur ETA sont des cibles thérapeutiques efficaces puisqu'un antagoniste de l'ETA permet une accélération de la régression de la vasculopathie pulmonaire d'hyperdébit après l'arrêt du shunt.

Le principal défaut de nos modèles est qu'ils ne reflétaient qu'une partie de la maladie et ne tenaient pas compte de l'interaction des différents territoires pulmonaires et des conséquences cardiaques de l'HP-PE.

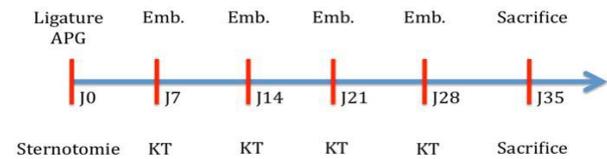
Des tentatives de modélisation de l'HP-PE ont déjà été publiées (4-8). La modélisation de l'HP-PE se heurte à deux principaux problèmes. Le premier est le fort potentiel fibrinolytique d'un *endothélium* pulmonaire normal. En effet, il a été montré que trois heures après une embolie pulmonaire fibrinocruorique chez le chien (4), il ne restait plus que 30 % du volume initialement embolisé. Pour pallier ce problème, la même équipe a tenté d'utiliser sans succès l'Acide tranexamique (5) et le PAI-1 (6) afin de retarder au maximum la résorption des caillots embolisés à répétition. Le deuxième problème concerne les facultés d'adaptation de la circulation pulmonaire à l'obstruction. En effet, la circulation pulmonaire normale se compose des vaisseaux proximaux élastiques et du lit capillaire pulmonaire résistif. Les vaisseaux proximaux transmettent par un effet Windkessel le flux sanguin qu'ils ont emmagasiné au cours de la systole. Le lit capillaire pulmonaire a deux propriétés lesquelles sont le recrutement et la dilatation. Ces deux propriétés font que jusqu'à 50 % d'obstruction vasculaire pulmonaire, les résistances pulmonaires totales ne varient pas. Le problème posé aux autres tentatives de modélisation de l'HP-PE utilisant du matériel inerte donc non dégradable est un problème de temps. En effet, une semaine après chaque embolisation les pressions pulmonaires et les résistances pulmonaires revenaient à la normale (7). Il faut attendre plus de 60 jours pour voir une augmentation des pressions pulmonaires après embolisations itératives de microbilles (8). Enfin, même si au bout de deux mois d'embolisations itératives les prémices d'une hypertension pulmonaire surviennent, il ne s'agit pas pour autant d'un modèle d'HP-PE. En effet, les embolies sont de petite taille et aucune lésion histologique d'hypervascularisation bronchique, de vasculopathie post-obstructive ou d'hyperdébit n'ont été observées. De plus, il n'y a pas d'obstruction vasculaire proximale.

Le but de cette étude était de modéliser l'hypertension pulmonaire post-embolique chez le cochon en associant les deux territoires vasculaires pulmonaires obstrués et non obstrués. Le modèle devait être validé, fiable, reproductible et facilement utilisable pour des études ultérieures (durée de modélisation < 10 semaines).

## Matériel et méthode

Le modèle mis au point consiste à ligaturer l'artère pulmonaire gauche afin de recruter et de dilater un maximum du lit

### HTTP-PE



### SHAM

Figure 1. Design de l'étude.

capillaire pulmonaire restant. L'hypertension pulmonaire chronique est ensuite obtenue par embolisations itératives dans l'artère pulmonaire droite après le départ de l'artère lobaire supérieure droite de colle tissulaire Histoacryl®. Cette colle est un monomère de n-butyl-2-cyanoacrylate qui polymérise quasiment instantanément en présence de liquide tissulaire pour former une substance solide. On assistait donc au fur et à mesure des embolisations à la formation de thrombus proximaux non résorbés et non résorbables lobaires inférieurs. On associe donc dans ce modèle un territoire en ischémie chronique (poumon gauche), un territoire en hyperdébit relatif (lobe supérieur droit) et un territoire avec des ischémies d'âge différent.

Deux groupes de cinq cochons d'un poids moyen de 22 +/- 2 kg ont été comparés. Le groupe HP-PE avait une ligature de l'artère pulmonaire gauche à J0, une embolisation hebdomadaire d'histoacryl par voie endovasculaire pendant quatre semaines (J7, J14, J21, J28) et était étudié cinq semaines après le début de l'expérimentation (J35). Le groupe Sham avait uniquement une dissection de l'artère pulmonaire gauche associée à une embolisation hebdomadaire de sérum physiologique et était étudié à J35 (Fig. 1).

L'abord chirurgical pour le cathétérisme droit et l'injection d'Histoacryl® était une cervicotomie médiane. La veine jugulaire externe était disséquée pour la mise en place d'un introducteur de 8Fr (RADIFOCUS INTRODUCER II, TERUMO®). Un

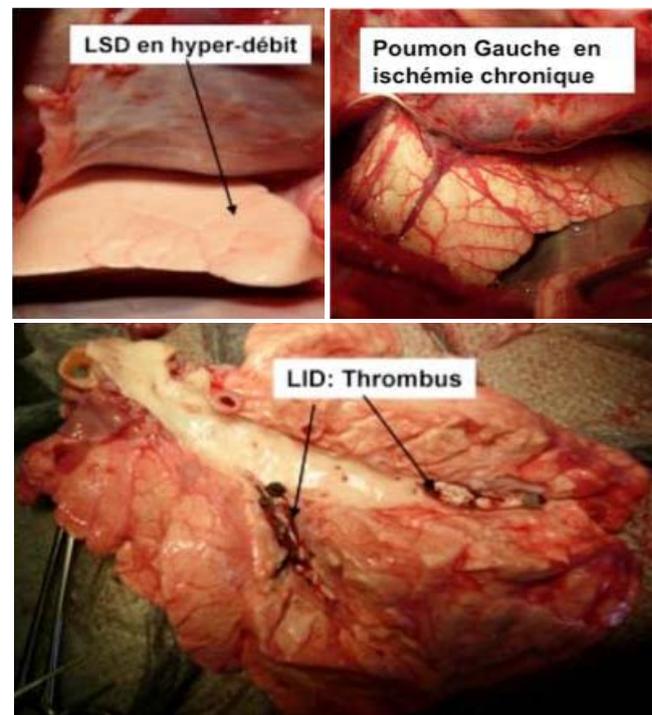


Figure 2. Morphologie du poumon.

Le lobe supérieur droit paraît indemne de lésion alors que le poumon gauche est le siège d'une hypervascularisation bronchique traduisant une ischémie chronique. Le thrombus à l'intérieur de l'artère du lobe inférieur droit formé d'Histoacryl et de fibrine persiste.

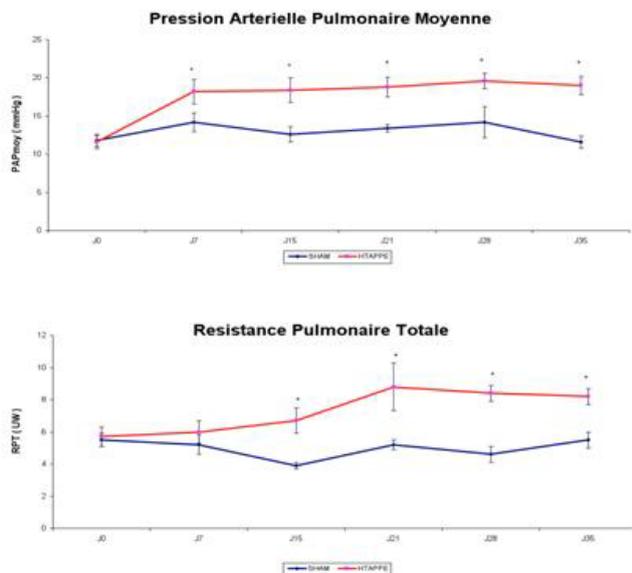


Figure 3. Données hémodynamiques recueillies par cathétérisme cardiaque droit selon Swan Ganz.

cathéter d'angiographie de 5Fr (TERUMO® Medical Corporation, États-Unis) et un cathéter de Swan Ganz (Edwards, États-Unis) pouvaient ainsi être insérés jusque dans l'arbre vasculaire pulmonaire sous contrôle angiographique. Un cathéter artériel PiCCO (PULSION France) était inséré dans l'artère carotide pour monitorer en continu les pressions artérielles systémiques et le débit cardiaque par thermodilution. Les données hémodynamiques étaient recueillies avant et après chaque manipulation. Avant le sacrifice de l'animal, une courbe Pression-Débit était réalisée afin d'estimer parfaitement les résistances pulmonaires totales (pente de la courbe). La variation du débit cardiaque était obtenue en clampant partiellement la veine cave inférieure.

L'embolisation d'Histoacryl se faisait à travers le cathéter d'angiographie de 5Fr placé à l'origine de l'artère lobaire inférieure. Le placement de la sonde était contrôlé par scopie. La quantité d'Histoacryl injectée à chaque séance était de 1 ml.

Avant chaque manipulation, une échocardiographie a été réalisée afin de mesurer les paramètres suivants : diamètres téléstolotique et télédiastolotique du Ventricule Gauche (VG), diamètre de l'artère pulmonaire, diamètre de l'anneau tricuspide, épaisseur de la paroi du Ventricule Droit (VD), mouvement ascendant de l'anneau tricuspide (TAPSE), estimation de la pression artérielle pulmonaire systolique (PAPs), et de la fraction de raccourcissement ventriculaire.

## Résultats

### Morphologie

Dans le groupe HP-PE, le poumon gauche est le siège d'une hypervascularisation bronchique typique de l'ischémie pulmonaire chronique. Le lobe supérieur droit est sans particularité. Le lobe inférieur droit est parfois le siège d'infarctus pulmonaires triangulaires à base pleurale. Le ventricule droit est épaissi (Fig. 2).

### Données hémodynamiques

Les paramètres (moyenne ± écart-type) des différentes variables hémodynamiques mesurées avant le sacrifice des animaux sont consignés dans le tableau 1.

Au bout de cinq semaines de notre protocole, la PAPmoy ( $19.2 \pm 2$  mmHg vs  $11,6 \pm 1,8$  mmHg,  $p < 0,05$ ), et les RPT ( $8.4 \pm 2$  UW vs  $5.5 \pm 1.1$  UW,  $p < 0,05$ ) sont significativement plus élevées dans le groupe HP-PE (Fig. 3). Cette différence est restée significative depuis le premier épisode d'embolisation. Le débit cardiaque n'est pas significativement différent entre les deux groupes ( $2.3 \pm 0.4$  l/min vs  $2.2 \pm 0.7$  l/min,  $p = NS$ ).

### Données échographiques

L'échographie cardiaque a mis en évidence un remodelage du ventricule droit démarrant dès la première injection d'Histoacryl. Ce remodelage comprend un épaississement du ventricule droit, une augmentation de la pression artérielle pulmonaire systolique, une augmentation de la taille de l'anneau tricuspide et du tronc de l'artère pulmonaire et une diminution du TAPSE. Le débit cardiaque et la fraction de raccourcissement restent identiques aux valeurs du groupe Sham montrant que le ventricule droit n'est pas encore défaillant et ne retient pas sur la fonction du cœur gauche. En effet, bien que notre modèle retranscrive l'ensemble des signes échographiques d'un cœur pulmonaire chronique, il ne modélise que la phase précoce de la maladie. Nous ne mettons pas en évidence de défaillance cardiaque. En revanche le TAPSE, signe spécifique de la fonction ventriculaire droite, est diminuée dans le groupe HP-PE montrant le dépassement des phénomènes adaptatifs du ventricule droit. La prolongation de notre modèle à plus de cinq semaines pourrait permettre d'étudier la défaillance cardiaque droite des HP-PE (Fig. 4).

Tableau I. Recueil des données hémodynamiques au cours de la modélisation.

| Hemodynamique HP-PE x SHAM |            |             |             |             |             |            |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
|                            | J0         | J7          | J15         | J21         | J28         | J35        |
| <b>PAPmoy (mmHg)</b>       |            |             |             |             |             |            |
| HP-PE                      | 11.6+/-1.9 | 18.4+/-3.5* | 18.8+/-2.9* | 19.6+/-2.3* | 17.8+/-2.6* | 19.2+/-2*  |
| SHAM                       | 11.8+/-1.8 | 14.2+/-2.9  | 12.6+/-2.3  | 13.4+/-1.1  | 14.2+/-4.4  | 11.6+/-1.8 |
| <b>RPT (UW)</b>            |            |             |             |             |             |            |
| HP-PE                      | 5.7+/-1.2  | 6.0+/-1.5   | 6.5+/-1.7*  | 8.7+/-3.2*  | 8.4+/-1.1*  | 8.4+/-2*   |
| SHAM                       | 5.5+/-0.9  | 5.2+/-1.3   | 3.9+/-0.4   | 5.2+/-0.6   | 4.6+/-1.1   | 5.5+/-1.1  |
| <b>Dc (l/mi,)</b>          |            |             |             |             |             |            |
| HP-PE                      | 2.1+/-0.4  | 3.1+/-0.8*  | 2.9+/-0.5*  | 2.3+/-0.8   | 2.3+/-0.03  | 2.3+/-0.4  |
| SHAM                       | 2.1+/-0.2  | 2.9+/-0.6*  | 3.1+/-0.6   | 2.4+/-0.4   | 3.1+/-0.5   | 2.2+/-0.7  |

Données en moyenne +/- DS

\* $p < 0.05$  HP-PE vs SHAM

PAPmoy : pression artérielle pulmonaire moyenne ; RPT : résistances pulmonaires totales, Dc : débit cardiaque

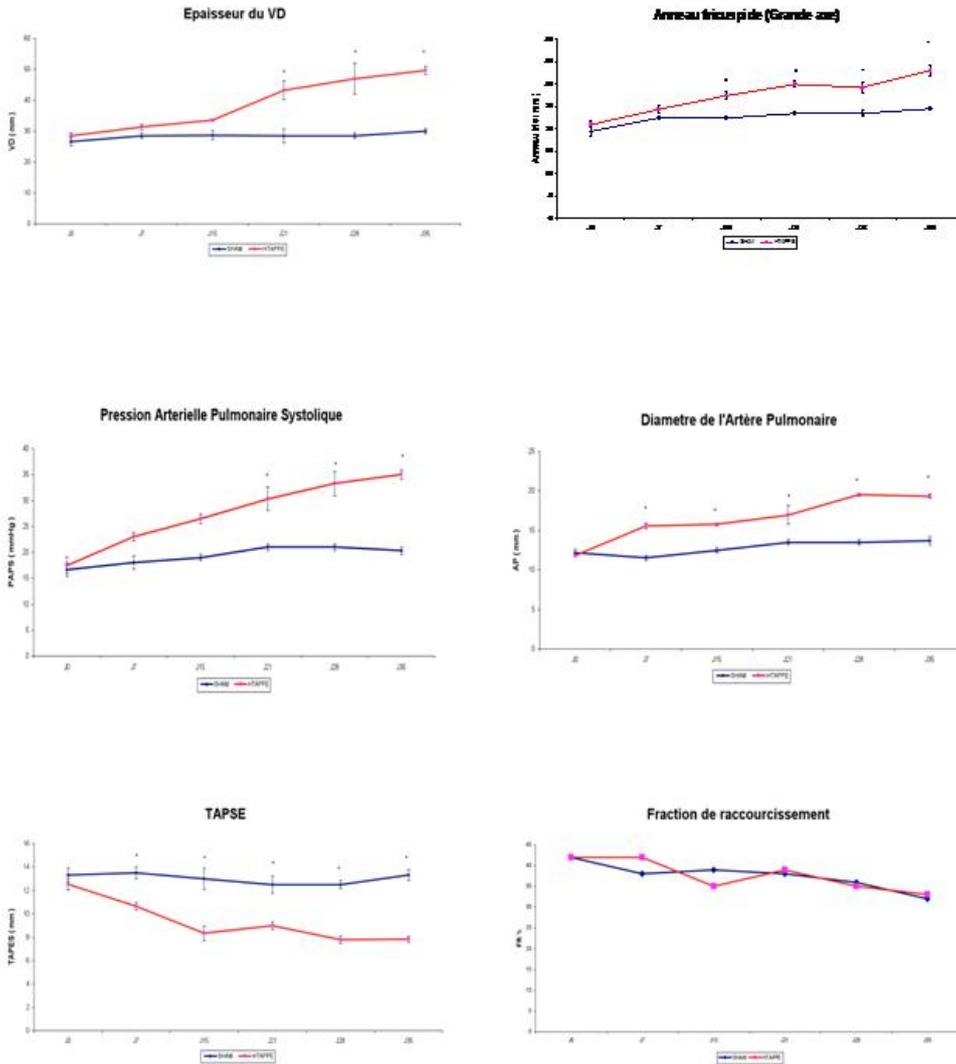


Figure 4. Données échographiques au terme de cinq semaines de modélisation (\*p<0.05 HP-PE vs SHAM).

### Étude microscopique, morphométrie des artéioles pulmonaires

Nous avons retrouvé les lésions de vasculopathie pulmonaire distale à type d'épaississement de la média des territoires obstrués (vasculopathie post-obstructive) et des territoires non obstrués (notre première étude). Le fait de trouver une vasculopathie pulmonaire distale atteste que l'occlusion du lobe inférieur droit par embolisation est une occlusion proximale induisant des lésions d'ischémie pulmonaire chronique d'aval (Fig. 5).

Cette vasculopathie distale était absente dans les poumons du groupe témoin (média = 29 %±9) ; la différence était statistiquement significative (p<0,001).

### Étude microscopique, hypervascularisation bronchique

Les artères bronchiques sous muqueuses étaient de petite taille et normalement distribuées dans le groupe SHAM et le lobe supérieur droit en hyperdébit (nombre moyen d'artères bronchiques par bronche = 2+/-0.8 vs 2.2+/-0.8, p>0.05). En revanche, au sein du poumon gauche en ischémie chronique (8.6+/-5.1) et du lobe inférieur embolisé (5.5+/-4, p<0.05), nous avons mis en évidence une hypervascularisation bronchique identique à celle rencontrée dans nos précédents modèles. Les artères bronchiques sont dilatées et plus nombreuses.

### Conclusions

Nous avons mis au point pour la première fois un modèle d'hypertension pulmonaire post-embolique associant les deux territoires vasculaires pulmonaires de la maladie. Notre modèle reproduit les lésions histologiques pulmonaires de ces deux territoires déjà modélisés et étudiés séparément dans notre laboratoire. De plus, il existe un remodelage du ventri-

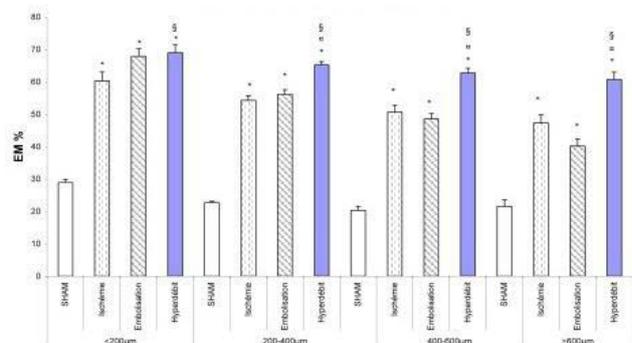
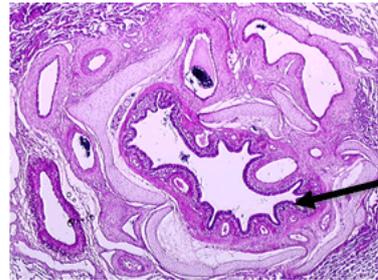
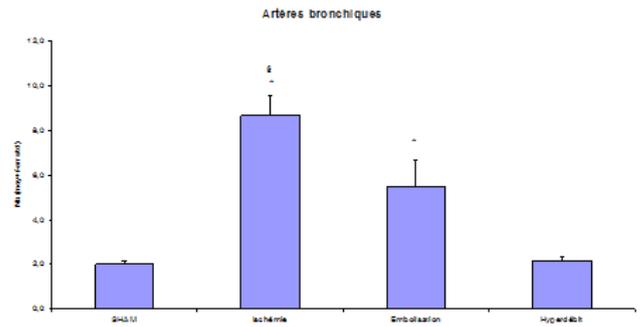


Figure 5. Calcul du pourcentage de l'épaisseur de la média (EM %) au niveau des artéioles pulmonaires au sein d'un poumon témoin (SHAM), du lobe supérieur droit (hyperdébit), du lobe inférieur droit (embolisation) et du poumon gauche (ischémie). \* p<0.05 vs SHAM § p<0.05 Embolisation vs Hyperdébit § p<0.05 Ischémie vs Hyperdébit.

cule droit ayant les caractéristiques du cœur pulmonaire chronique. Les problèmes de modélisation liés à l'adaptation de la circulation pulmonaire et aux propriétés fibrinolytiques de l'*endothélium* pulmonaire ont été résolus par la réalisation première d'une ligature de l'artère pulmonaire gauche et par l'utilisation d'une colle inerte se solidifiant au moindre contact avec un produit biologique. En seulement cinq semaines notre modèle reproduit les caractéristiques morphologiques, hémodynamiques et microscopiques de l'HP-PE. Cependant, une durée de modélisation plus longue permettrait de mieux modéliser la maladie à un stade plus avancé en aggravant les données hémodynamiques (PAPm>25 mmHg, diminution du débit cardiaque). Ce modèle permettra ainsi la réalisation d'études ultérieures sur les relations entre les deux territoires vasculaires pulmonaires et la réelle efficacité des traitements utilisés aujourd'hui pour l'HTAP sur la pathologie microvasculaire post-obstructive et d'hyperdébit.

## Références

1. Fadel E, Michel RP, Eddahibi S, Bernatchez R, Mazmanian GM et al. Regression of postobstructive vasculopathy after revascularization of chronically obstructed pulmonary artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 ; 127 : 1009-17.
2. Fadel E, Mazmanian GM, Baudet B, Detruit H, Verhoye JP et al. Endothelial nitric oxide synthase function in pig lung after chronic pulmonary artery obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 162 : 1429-34.
3. Fadel E, Mazmanian GM, Chapelier A, Baudet B, Detruit H et al. Lung reperfusion injury after chronic or acute unilateral pulmonary artery occlusion. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : 1294-300.
4. Moser KM, Guisan M, Bartimmo EE, Longo AM, Harsanyi PG et al. In vivo and post mortem dissolution rates of pulmonary emboli and venous thrombi in the dog. *Circulation* 1973 ; 48 : 170-8.
5. Moser KM, Cantor JP, Olman M, Villespin I, Graif JL et al. Chronic pulmonary thromboembolism in dogs treated with tranexamic acid. *Circulation* 1991 ; 83 : 1371-9.
6. Marsh JJ, Konopka RG, Lang IM, Wang HY, Pedersen C et al. Suppression of thrombolysis in a canine model of pulmonary embolism. *Circulation* 1994 ; 90 : 3091-7.
7. Kim H, Yung GL, Marsh JJ, Konopka RG, Pedersen CA et al. Endothelin mediates pulmonary vascular remodeling in a canine model of chronic embolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2000 ; 15 : 640-8.
8. Sato H, Hall CM, Griffith GW, Johnson KF, McGillicuddy JW et al. Large animal model of chronic pulmonary hypertension. *ASAIO J* 2008 ; 54 : 396-400.



Artère bronchique sous muqueuse dilatée

Figure 6. Nombre d'artères bronchiques sous-muqueuses par bronche dans le poumon témoin (SHAM), le lobe supérieur droit (hyperdébit), le lobe inférieur droit (embolisation) et le poumon gauche (ischémie).  $p < 0.05$  vs SHAM et hyperdébit §  $p < 0.05$  Ischémie vs embolisation.