Ecole doctorale ED 425
« Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué »
Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire
Discipline N°4101166
Série N°1178

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 05/07/2012
Par

LY TU

Innovation Thérapeutique dans la Dysfonction Endothéliale Associée à L'Hypertension Artérielle Pulmonaire

Docteur Christophe GUIGNABERT	**Directeur de Thèse**
Professeur Marc HUMBERT	**Co-Directeur de Thèse**

Composition du jury

Professeur Gérald SIMONNEAU	**Président**
Professeur Anh Tuan DINH-XUAN	**Rapporteur**
Professeur Dominique ISRAEL-BIET	**Rapporteur**
Professeur Luc MOUTHON	**Examinateur**

REMERCIEMENTS

Aux Directeurs de ma Thèse

Au Professeur Marc HUMBERT, pour l'accueil au sein de son équipe, pour son soutien, sa confiance et ses nombreux précieux conseils.

Au Docteur Christophe GUIGNABERT, pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années et m'avoir guidé dans la réalisation de ces travaux, pour son amitié précieuse et ses encouragements permanents.

Aux membres du Jury

Au Professeur Gérald SIMONNEAU, pour m'avoir fait l'honneur d'être président de mon jury de thèse.

Au Professeur Anh Tuan DINH-XUAN et Professeur Dominique ISRAEL-BIET, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et pour le temps que vous avez consacré à la correction de mon manuscrit.

Au Professeur Luc MOUTHON, merci également d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Au laboratoire où j'ai effectué cette thèse

Merci à Alice, Andrei, Barbara, Carole, Kristel, Charlène, David, Frédéric, Frances, Inés, Laurence, Marie-Camille, Nicolas, Natasha, Patricia.

Aux membres de l'équipe Recherche et de l'équipe Clinique :

Eddahibi Saadia, Renaud Jean-François, Cohen-Kaminsky Sylvia, Dorfmüller Peter, German-Fattal Michèle, Dutheil Yvonne, Rucker-Martin Catherine, Gouadon Elodie, Capuano Véronique, Ruchon Yann, Lecerf Florence, Klingelschmitt Isabelle, Lallemand Anne, Hoang Eric, Dumas Sébastian, Bru-Mercier Gilles, Ranchoux Benoit.

Aux membres de l'équipe des chirurgiens : Dartevelle Philippe, Fadel Elie, Mercier Olaf, Mussot Sacha, Fabre Dominique, Benoit Decante et à tout le personnel du LCE

A toutes les personnes qui ont été de passage dans l'équipe.

A ma famille et à mes Amis

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 3

RESUME 4

REVUE GENERALE SUR L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE 5

1 La Circulation Pulmonaire 6

2 Définition et Classification de l'Hypertension Pulmonaire 7

3 Anatomo-Pathobiologie de l'HTAP 9

4 Physiopathologie de l'HTAP 11

4.1 Aspects Cellulaires 12

4.1.1 Les Cellules Endothéliales Pulmonaires 12
4.1.2 Les Cellules Musculaires Lisses d'Artères Pulmonaires 13
4.1.3 Les Fibroblastes Pulmonaires des Parois Vasculaires 14
4.1.4 Les Cellules Inflammatoires 15
4.1.5 Les Plaquettes 16
4.1.6 Les Cellules Progénitrices 17

4.2 Aspects Moléculaires 17

4.2.1 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans le Contrôle du Tonus Vasculaire 17
4.2.2 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans la Prolifération et la Survie Cellulaire 18
4.2.3 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans le Remodelage Matriciel 27
4.2.4 Les Acteurs Moléculaires de l'Inflammation et de l'Auto-immunité 28
4.2.5 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans les Changements Métaboliques 31

4.3 Aspects Génétiques et Environnementaux 32

4.3.1 Le Gène *BMPR-II* 32
4.3.2 Les Autres Gènes Impliqués dans l'HTAP 35
4.3.3 Les Facteurs Environnementaux 37

4.4 Modèles animaux d'HTAP 38

4.4.1 Hypertension Pulmonaire induite par la Monocrotaline chez le Rat 39
4.4.2 Hypertension Pulmonaire Hypoxique chez les Rongeurs (rats/souris) 42
4.4.3 Modèle d'HP induite par le SUGEN 5416 + Hypoxie (SuHx) 44
4.4.4 Modèles animaux d'Hypertension Pulmonaire sur Shunt 44
4.4.5 Animaux Transgéniques et Hypertension Pulmonaire 45

5 Prise en Charge Actuelle des Patients HTAP 46

5.1 Les Bloqueurs Calciques 46

5.2 Prostacyclines et Analogues 47

5.3 Les Inhibiteurs de la Voie de l'ET-1 47

5.4 Les Inhibiteurs de la Phosphodiestérase-5 47

5.5 En Cours de Développement et/ou d'Etude en Phase Clinique 48

5.5.1 Les Activateurs de la Guanylate Cyclase 48
5.5.2 Les Molécules Anti-Prolifératives 48

5.5.3 L'Administration de Cellules Progénitrices 48

REVUE SUR LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE ASSOCIEE A L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE 50

1 Le Déséquilibre entre Vasodilatateurs/Vasoconstricteurs 53

1.1 Diminution des Facteurs Vaso-dilatateurs 54

1.1.1 Le Monoxyde d'Azote (NO) 54
1.1.2 La Prostacycline 55
1.2 Augmentation des Vaso-constricteurs 56

1.2.1 L'Endotheline-1 (ET-1) 56
1.2.2 La Sérotonine (5-HT) 56
1.2.3 La Tromboxane 56
2 Communications Intercellulaires Aberrantes de la CE-HTAP 57

2.1 Communications Aberrantes entre CE et CML dans l'HTAP 57

2.2 Communication Aberrante entre CE et Cellules Inflammatoires 61

3 Anomalies de l'Hypercoagulabilité 62

3.1 P-Selectine et Thrombomoduline 64

3.2 Le Facteur Von Willebrand (vWF) 65

3.3 Le Système Plasminogène–Plasmine 65

4 Les anomalies Endothéliales Intrinsèques 66

MATERIELS ET METHODES 68

HYPOTHESES DE TRAVAIL 80

DISCUSSION 138

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 145

AUTRES PROJETS COLLABORATIFS MENES EN PARALLELE DE CES TRAVAUX DE DOCTORAT 147

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 156

ABREVIATIONS

BMP	Bone morphogenetic protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large
BMP-R	Bone morphogenetic protein-receptor
BSA	Albumine de sérum bovin
CCB	Calcium-Channel Blokers
CE	Cellule endothéliale
CML	Cellule musculaire lisse
EGF	Epidermal growth factor
ERA	Endothelin Receptor Antagonist
ET-1	Endothéline-1
FGF	Fibroblast growth factor
ITK	Inhibiteur tyrosine kinase
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTAPi	Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique
HTAPh	Hypertension artérielle pulmonaire héritable
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéase de la matrice extracellulaire
NO	Nitric oxide ou monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase ou synthétase du monoxyde d'azote
NYHA	New York Heart Association
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-derivated growth factor
PCWP	Pulmonary Capillary Wedge Pressure
RTQ-PCR	Real time quantitative PCR ou PCR quantitative en temps réel
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SVF	Sérum de veau fœtal
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	Facteur de von Willebrand

RESUME

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave caractérisée par une obstruction progressive des petites artères pulmonaires, conduisant à une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et à terme à une défaillance cardiaque droite et au décès du patient. La vasoconstriction, le remodelage vasculaire pulmonaire, la thrombose *in situ* et la dysfonction endothéliale sont autant de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la maladie. Ces travaux de doctorat ont visé à préciser et mieux comprendre le phénotype anormal de la cellule endothéliale (CE) pulmonaire de patients HTAPi afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques adéquates pour corriger et restaurer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension pulmonaire. Plusieurs perturbations fonctionnelles liées à des anomalies moléculaires ont pu être identifiées. Les CE HTAPi sont caractérisées par une prolifération, une migration, une survie et une réponse excessive à différents facteurs de croissance : PDGF, EGF, et FGF2. Parmi les anomalies moléculaires à l'origine de ces perturbations fonctionnelles, nous avons retrouvé une production et une libération anormale de FGF2, de MMP2, de MIF, d'IL-6 et de MCP-1, mais aussi une activité constitutive de la MAPK, une surexpression des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL, de FGFR2, de p130cas et de CD74. Cette meilleure compréhension de la CE-HTAPi a déjà permis d'identifier plusieurs cibles qui pourraient être évaluées et à également permis de soulever un certain nombre de questions qui requiert des études plus poussées.

Mots clés : HTAP ; Dysfonction Endothéliale ; Innovations Thérapeutiques ; Facteurs de Croissance ; Inflammation ; Signalisation Cellulaire ; Prolifération ; Apoptose ; Modèles Animaux

REVUE GENERALE SUR

L'HYPERTENSION ARTERIELLE

PULMONAIRE

1 La Circulation Pulmonaire

La circulation sanguine pulmonaire s'effectue au travers de deux systèmes : la circulation pulmonaire et la circulation bronchique (systémique). La circulation pulmonaire (Figure 1) issue du cœur droit permet les échanges respiratoires dans les poumons. Le sang veineux quitte le cœur droit par l'artère pulmonaire, qui se divise successivement pour donner les artérioles pulmonaires donnant naissance aux capillaires pulmonaires. Le réseau de capillaires pulmonaires tapisse la paroi des alvéoles et assure les échanges gazeux au travers de la barrière alvéolo-capillaires permettant la ré-oxygénation du sang. Le sang riche en oxygène (O_2) est d'abord collecté dans les petites veines pulmonaires qui rejoignent ensuite les veines pulmonaires et le cœur gauche.

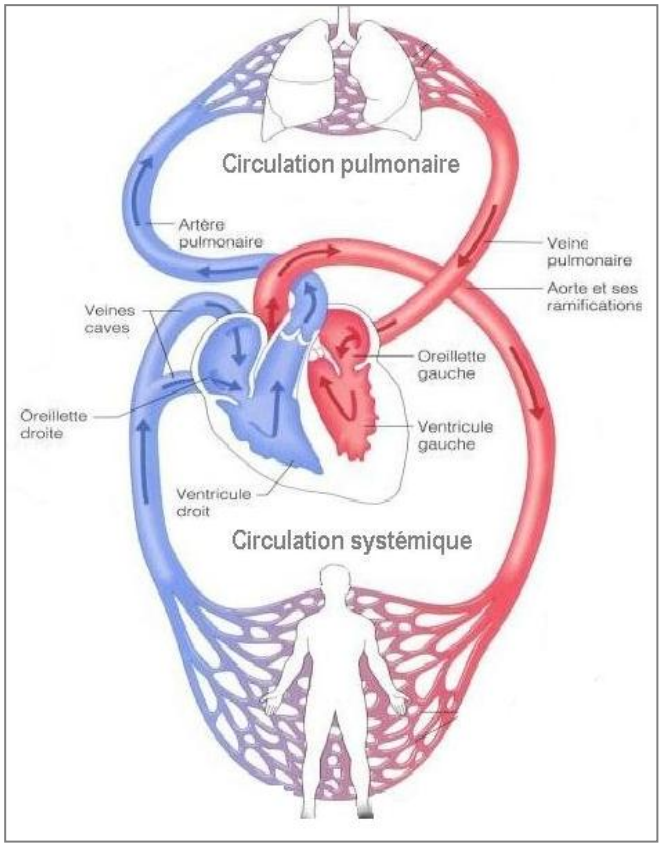


***FIGURE 1** : Circulation pulmonaire et circulation systémique*

Le lit vasculaire pulmonaire est unique de part sa structure et de part ses fonctions. Le poumon est le seul organe à recevoir 100% du débit cardiaque. De plus, la circulation pulmonaire est un système à faible pression, à faible résistance, haute densité et à haut débit et ceci est principalement expliqué par deux caractéristiques essentiels propres : 1) une haute compliance des artérioles pré-capillaires qui s'explique par une paroi mince, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) recouvrant une fine couche de cellules musculaires lisses (CML), alors que la paroi des vaisseaux systémiques est plus épaisse et très musculeuse; 2) une haute capacité à recruter des vaisseaux pour faire face à une augmentation de flux sanguin. En l'absence d'anomalies et en condition normoxique, la pression moyenne dans l'artère pulmonaire est de l'ordre de 14 ± 3 mm Hg. De plus, d'importantes variations locales de vaso-réactivité en réponse à divers stimuli, que se soit l'exposition à l'hypoxie (PaO_2 < 60mmHg (Guénard 2001)) ou au monoxyde d'azote (NO), ont été clairement mises en évidence: plus le diamètre des artères pulmonaires diminue, plus la réponse vaso-constrictrice est importante (Archer, Huang et al. 1996; Coppock, Martens

et al. 2001; Coppock and Tamkun 2001). Cette réponse du lit vasculaire pulmonaire contraste avec la réponse obtenue avec des vaisseaux systémiques pour les mêmes stimuli. Bien que des distributions différentielles de certains canaux potassiques puissent expliquer ces différences, les mécanismes précis de ces particularités propres à la circulation pulmonaire restent encore à être éclaircis.

2 Définition et Classification de l'Hypertension Pulmonaire

Le terme «hypertension pulmonaire» (HP) décrit l'existence d'une pression accrue dans la circulation pulmonaire. Sous le terme « d'hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) sont regroupées différentes maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et une défaillance ventriculaire droite. L'échographie cardiaque permet le dépistage de l'HTAP, mais le diagnostic formel nécessite un cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25mmHg au repos et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15mmHg, éliminant le diagnostic de cardiopathie gauche.

La classification des HP, qui est régulièrement révisée au cours de congrès mondiaux, a pour objectif d'individualiser des situations présentant des similitudes physiopathologiques, cliniques et de prise en charge thérapeutique. Une nouvelle classification des HP a été proposée en 2008 à l'occasion du quatrième congrès mondial de l'hypertension pulmonaire qui s'est déroulé à Dana Point (Figure 2) (Simonneau, Robbins et al. 2009).

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au premier groupe de cette classification : les HTAP (Groupe 1). Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en cinq principaux sous-groupes : les HTAP idiopathiques (HTAPi, anciennement dénommées HTAP primitives) définies par la survenue de la maladie en l'absence de facteurs de risque connus ou associés, les HTAP héritables (HTAPh, anciennement dénommées HTAP familiales), définies par la transmission de la maladie par descendance et/ou présence chez un patient d'une mutation d'un des gènes connus pour prédisposer au développement de l'HTAP, les HTAP associées à la consommation de toxines dont la prise d'anorexigènes, les HTAP associées à diverses pathologies (connectivites, infection par le virus de l'immunodéficience humaine, cardiopathies congénitales avec shunt gauche-droit, hypertension portale, schistosomiase, l'anémie hémolytique chronique) et l'HTAP persistante du nouveau-né. Dans la nouvelle classification, les HTAPi et les HTAP associées à ces diverses pathologies sont rapprochées, car toutes ces situations sont caractérisées par une

dysfonction endothéliale pulmonaire et des modifications histologiques semblables, justifiant d'une même conduite dans la prise en charge clinique. A ces cinq sous-groupes, il faut associer la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire qui sont caractérisées par une atteinte veinulaire ou capillaire prédominante (Groupe 1'). Bien que ces deux maladies présentent un risque d'œdème pulmonaire en cas de traitement vasodilatateur (principal traitement de l'HTAPi en particulier par la prostacycline intraveineuse), les très nombreuses similitudes cliniques et physiopathologiques avec les HTAPi, ont justifié de les inclure dans le groupe des HTAP.

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

- 1.1. Idiopathique
- 1.2. Héritable
  - 1.2.1. *BMPR2*
  - 1.2.2. *ALK1* (*ACVRL1*), *endogline* (avec ou sans maladie de Rendu-Osler)
  - 1.2.3. Gène inconnu.
  - 1.3. Induite par des médicaments ou des toxiques
- 1.4. Associée à :
  - 1.4.1. Connectivites
  - 1.4.2. Infection par le VIH
  - 1.4.3. Hypertension portale
  - 1.4.4. Cardiopathies congénitales
  - 1.4.5. Schistosomiases
  - 1.4.6. Anémies hémolytiques chroniques
- 1.5. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire

2. Hypertension pulmonaire des cardiopathies gauches

- 2.1. Dysfonction systolique
- 2.2. Dysfonction diastolique
- 2.3. Valvulopathies

3. Hypertension pulmonaire des maladies respiratoires et/ou hypoxémies chroniques

- 3.1. BPCO
- 3.2. Pneumopathies interstitielles
- 3.3. Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives
- 3.4. Syndromes d'apnées du sommeil
- 3.5. Syndromes d'hypoventilation alvéolaire
- 3.6. Exposition chronique à l'altitude élevée
- 3.7. Anomalies du développement

4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique

5. Hypertension pulmonaire de mécanisme multifactoriel ou incertain

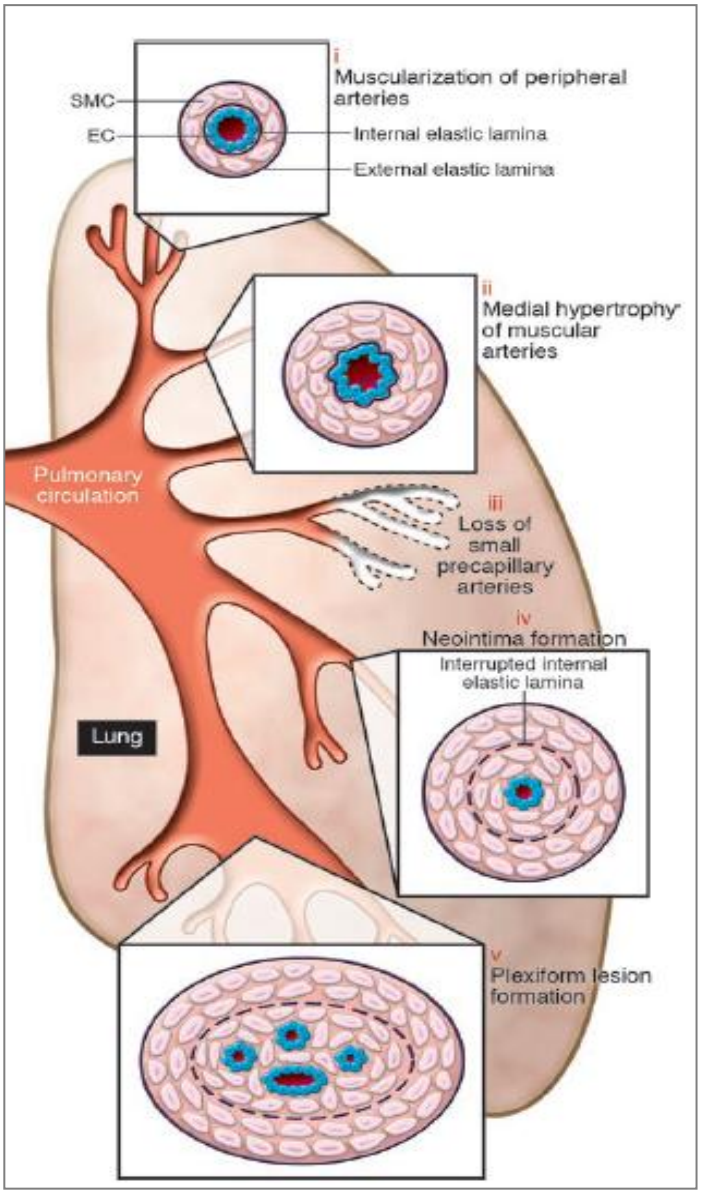
- 5.1. Maladies hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie.
- 5.2. Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioleiomyomatose, neurofibromatose, vascularites.
- 5.3. Maladies métaboliques : glycogénoses, maladie de Gaucher, dysthyroïdies.
- 5.4. Autres : obstructions vasculaires pulmonaires tumorales, médiastinites, Fibreuses, insuffisance rénale chronique en dialyse.

***FIGURE 2** : Classification clinique des hypertensions pulmonaires de Dana Point (2008) (Simonneau, Robbins et al. 2009)*

Par définition, les HP expliquées par une cause bien identifiée et pouvant bénéficier d'un traitement spécifique comme l'HP des cardiopathies gauches, des maladies respiratoires chroniques hypoxémiantes, ou post-embolique chronique n'appartiennent pas au groupe des HTAP proprement dites mais forment respectivement le groupe 3 et 4.

Des affections constituant des causes rares d'HP d'origine indéfinie ou multifactorielle sont maintenant individualisées dans un 5ème groupe comme notamment : maladies hématologiques, sarcoïdose, histiocytose X, neurofibromatose, lymphangioléiomyomatose (LAM). Enfin, les HP dues à une compression extrinsèque des vaisseaux pulmonaires par des adénopathies, des tumeurs, ou une fibrose médiastinale sont également classées dans ce dernier groupe.

3 Anatomo-Pathobiologie de l'HTAP



L'HTAP est caractérisée par plusieurs anomalies structurelles et fonctionnelles des petites artères pulmonaires (Voelkel and Tuder 1995; Voelkel and Tuder 1997; Rubin 1999; Humbert, Morrell et al. 2004; Mandegar, Fung et al. 2004; Rabinovitch 2005; Rabinovitch 2008; Morrell, Adnot et al. 2009).

***FIGURE 3** : Schéma illustrant les différentes anomalies vasculaires associées à l'hypertension pulmonaire. (i) Muscularisation anormale des artères distales pré-capillaires, (ii) L'hypertrophie de la média de grosses artères pulmonaires (iii) raréfaction des artères pré-capillaires (iv) la formation néo-intimale occlusive des vaisseaux de 100-500 µm et (v) la formation de lésions plexiformes dans ces gros vaisseaux. Il est à noter que contrairement au schéma ci-contre, la distribution de ces anomalies structurelles est uniformément réparti au sein des deux poumons (Rabinovitch 2008).*

Parmi celles-ci on distingue tout d'abord la **raréfaction** des artérioles pulmonaires distales (Figure 3). Cette réduction du nombre des vaisseaux du lit vasculaire pulmonaire est accompagnée par une augmentation de la résistance vasculaire, décrite dans des modèles expérimentaux d'HP. On retrouve également, une **néo-muscularisation** des petites artérioles pré-capillaires distales, normalement non-musculaires jusque dans l'acinus respiratoire. Les mécanismes cellulaires responsables de cette muscularisation de cette partie des vaisseaux pulmonaires ne sont pas complètement élucidés, mais l'une des hypothèses possibles est la prolifération des CML des artères pulmonaires pré-existantes ou encore la différenciation à partir des cellules précurseurs – pericytes ou autres (Meyrick and Reid 1980). De plus, les vaisseaux de plus gros calibre, entre 100 et 500µm, sont également touchés par **l'hypertrophie médiale et adventitielle** (Figure 3). L'épaississement de la paroi des artères pulmonaires proximales a été attribué à la prolifération et la migration anormale des CML existantes, ou leur différenciation à partir d'une population de cellules souches ou de fibrocytes (Davie, Crossno et al. 2004) ou encore des CE qui sont capables d'acquérir le phénotype de CML (Frid, Kale et al. 2002). D'autre part, on retrouve la formation de **néo-intima**, une couche supplémentaire constituée de myofibroblastes, de matrice extracellulaire (MEC) et d'infiltrats inflammatoires entre l'endothélium et la limitante élastique interne (Figure 3). Dans certains modèles expérimentaux d'HP, en particulier dans les modèles hypoxiques, les fibroblastes adventitiels semblent être les premières cellules activées et à proliférer et synthétiser des protéines de matrice en réponse aux signaux hypertensifs pulmonaires (Frid, Kale et al. 2002). Les mécanismes qui rendent possible la migration des fibroblastes adventitiels dans la média (et à un stade plus évolué dans l'intima) sont mal identifiés. Des données expérimentales suggèrent qu'il existe une surexpression des métalloprotéinases de la matrice (MMP), essentiellement les MMP-2 et MMP-9, et que ces protéases sont impliquées dans la migration des fibroblastes adventitiels et la formation de la néo-intima (Lepetit, Eddahibi et al. 2005; Chelladurai, Seeger et al. 2012). La néo-intima favorise l'occlusion et la re-canalisation des vaisseaux et contribue à la formation des **lésions plexiformes ou fibrose intimale concentrique (aspect en « bulbe d'oignon »),** dernier stade du remodelage vasculaire (Figure 3). Les lésions plexiformes ont longtemps été considérées comme spécifiques (pathognomoniques) des HTAPi, cependant plusieurs de ces complexes lésions vasculaires ont pu également être mises en évidence dans d'autres formes d'HTAP comme l'HTAP associée à des cardiopathies congénitales et des HTAP associées à des hypertensions portales. Ces lésions sont formées par une prolifération exubérante de CE et de myofibroblastes, formant des canaux microvasculaires endoluminaux dans une matrice oblitérante riche en collagène (Bjornsson and Edwards 1985). Toutes les étapes de l'installation et la progression de la maladie sont illustrées dans la Figure 4.

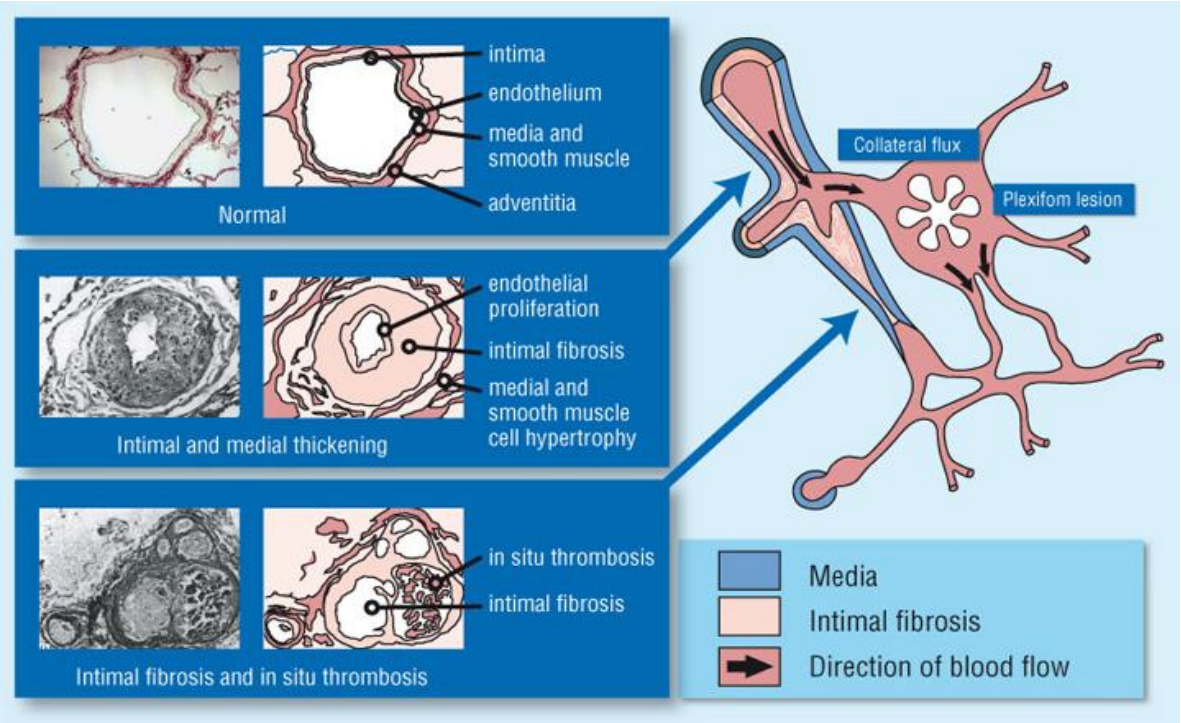


***FIGURE 4** : Schéma illustrant les différentes étapes caractéristiques du remodelage artériel vasculaire observé dans le cadre de l'HTAP. Tout d'abord, l'artère pulmonaire s'épaissie et se muscularise et son lumen se réduit progressivement. Puis, les anomalies structurelles évoluent et s'aggravent par le dépôt excessif de différents composés de la matrice extracellulaire (fibrose intimale) et la possible formation de thrombose in situ. Enfin et sous certaines conditions particulières encore obscures, cette obstruction au passage du flux sanguin peut générer la formation de lésions plexiformes (représentation schématique de droite) à certains endroits très particuliers. Ces lésions pourraient permettre une ré-irrigation de zones non-irriguées préalablement et/ou de défauts d'angiogenèse très particuliers.*

4 Physiopathologie de l'HTAP

Ces dernières années ont vu une augmentation remarquable de notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la pathobiologie de l'HTAP et ont permis le développement de plusieurs outils et molécules qui ont nettement amélioré la prise en charge des patients (Morrell, Adnot et al. 2009; O'Callaghan, Savale et al. 2011). Cependant, malgré le succès reconnu des médicaments existants dans le traitement des symptômes de l'HTAP, et l'amélioration de la survie, la plupart des patients finissent par échapper à leur thérapie et succombent à la maladie (Humbert, Sitbon et al. 2010; O'Callaghan, Savale et al. 2011). Dans les meilleures circonstances, une transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire peut être envisagée, mais cette solution reste lourde et largement insatisfaisante avec un taux de survie à 5 ans légèrement inférieur à 50%. C'est pourquoi l'amélioration et la précision de nos connaissances de la physiopathologie de l'HTAP est requise pour améliorer et identifier de

nouvelles cibles moléculaires et permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérés.

4.1 Aspects Cellulaires

4.1.1 Les Cellules Endothéliales Pulmonaires

L'endothélium vasculaire est à l'interface entre le milieu sanguin et la paroi interne des vaisseaux sanguins et contrôle le passage du plasma et des cellules depuis l'espace vasculaire vers l'espace extravasculaire. Cependant, les fonctions de l'endothélium ne se limitent pas qu'à un rôle de barrière, il joue également un rôle central dans l'homéostasie vasculaire. L'endothélium permet d'adapter localement et temporairement plusieurs fonctions vasculaires en réponse à divers stimuli. Il forme une monocouche de cellules quiescentes avec un *turnover* de quelques mois à quelques années. Les CE présentent une grande hétérogénéité structurelle et leur rôle dans la vasculature varie considérablement d'un organe à l'autre. En effet, les CE pulmonaires présentent de nombreuses particularités qui varient en fonction de leur localisation dans le lit vasculaire pulmonaire. Contrairement à l'endothélium systémique, les CE pulmonaires expriment fortement l'enzyme de conversion de l'angiotensine, la thrombomoduline (Wang, Yao et al. 1999) et la dispase membranaire (Ford, Stringer et al. 1992). Les CE en culture conservent *in vitro* certaines de ces caractéristiques, ce qui suggère que l'expression de ces gènes fait partie de ces cellules et représente donc une caractéristique intrinsèque en dehors de tout contexte environnemental (Tu, Dewachter et al. 2011).

Tout comme l'endothélium systémique, l'endothélium pulmonaire à la capacité de transiter d'un état quiescent, c'est-à-dire ne présentant pas de capacité d'adhésion, à un état activé et adhésif. Cette perte de quiescence pour un état activé est retrouvée dans l'HTAP et représente l'un des nombreux signes de la dysfonction endothéliale associée à la maladie. La dysfonction endothéliale est un phénomène physiopathologique souvent indépendant de la maladie et présent dans les phases précoces de différentes conditions pathologiques telles que l'athérosclérose et différents types de vasculopathies (Cines, Pollak et al. 1998). D'autres travaux menés sur des CE de patients HTAP ont révélé également beaucoup d'autres signes de dysfonction endothéliale. En effet, les CE-HTAP présentent une sur-expression de la synthase de l'endothéline-1 (ET-1) (Giaid, Michel et al. 1993), une diminution d'expression de la synthase endothéliale du NO (eNOS) (Giaid and Saleh 1995) et de synthase de la prostacycline (Tuder, Cool et al. 1999). De plus, les CE-HTAP présentent des expressions anormalement élevées de divers composés de la MEC comme la ténascine, la laminine, la fibronectine et l'élastine, révélant des défauts de la balance entre la production/dégradation de la MEC dans la paroi vasculaire (Rabinovitch 2001; Botto, Beretta et al. 2006). Plusieurs autres travaux ont

suggéré des défauts de balance entre prolifération/apoptose des CE pulmonaires dans les modèles animaux et qui semblent être, avec des anomalies de différenciation, à l'origine de la formation des lésions plexiformes (Cool, Stewart et al. 1999). Des expansions monoclonales de CE résistantes à l'apoptose (Voelkel, Cool et al. 2002; Sakao, Tatsumi et al. 2009; Sakao, Tatsumi et al. 2010) ont été décrites dans l'HTAP qui résulteraient de la multiplication de ces CE particulières au niveau de sites d'atteinte endothéliale (Masri, Xu et al. 2007; Tu, Dewachter et al. 2011)**.** Ces CE anormales ont été montrées comme sur-exprimant les récepteurs au VEGF (Cool, Stewart et al. 1999), sous-exprimant les récepteurs de type 2 du TGF-β (TGFBR2) et le facteur pro-apoptotique Bax (Yeager, Halley et al. 2001). En cohérence avec ces données, Lee *et al.* ont démontré que certaines CE qui composent les lésions plexiformes auraient une origine monoclonale (Lee, Shroyer et al. 1998). Beaucoup d'autres anomalies propres aux CE-HTAP ont été décrites et sont détaillées dans le chapitre de ces travaux de thèse (Chapitre 2).
Le(s) élément(s) à l'origine de cette perte d'adaptation (temporelle et locale) de la réponse vasculaire pulmonaire à divers stimuli reste(nt) encore inconnu(s). Cependant plusieurs modulateurs de dysfonction endothéliale comme les forces hémodynamiques (ou *shear stress*), les médiateurs inflammatoires ou hormonaux, les toxines, des modifications épigénétiques et une réduction du lit vasculaire pulmonaire font parties des éléments fortement suspectés. Cette dysfonction endothéliale est le reflet de modification du phénotype endothélial pulmonaire, ainsi une meilleure compréhension de ce phénotype anormal des CE-HTAP est requise.

4.1.2 Les Cellules Musculaires Lisses d'Artères Pulmonaires

Les CML font parties des éléments constitutifs majeurs des parois des artères pulmonaires (média). La prolifération et la migration excessive des CML d'artères pulmonaires (CML-AP) expliquent en partie la muscularisation de ces vaisseaux qui normalement sont non muscularisés, ainsi que la muscularisation exagérée des plus grosses artères pulmonaires (<500μm). Associés à ces potentiels prolifératifs et migratoires excessifs, les CML-AP HTAP synthétisent de manière plus importantes de nombreux composés de la MEC comme le collagène, la ténascine, la fibronectine et participent ainsi de manière active au remodelage artériel pulmonaire de la maladie (Jones and Rabinovitch 1996; Jones, Cowan et al. 1997; Jones, Crack et al. 1997; Jones, Jones et al. 1999; Rabinovitch 2001; Ma, Han et al. 2011; Wei, Warburton et al. 2012). En effet, la MEC constitue un réservoir très important de facteurs de croissance et de cytokines qui se retrouvent piégés temporairement avant d'être relargués suite à l'action de diverses protéases comme les MMP et les élastases (Mitani, Ueda et al. 1999; Lepetit, Eddahibi et al. 2005; Kim, Haghighat et al. 2011; Kwapiszewska, Markart et al. 2012).

La libération de ces différentes molécules crée un microenvironnement tissulaire favorable à la prolifération, à la survie et migration des CML et CE environnantes (Bendeck, Zempo et al. 1994; Jones, Cowan et al. 1997; Jones, Crack et al. 1997; Franco, Hou et al. 2002; Ma, Han et al. 2011). De plus, tout comme pour les CE pulmonaires, les CML-AP présentent plusieurs anomalies intrinsèques majeures qui jouent un rôle important pour le remodelage vasculaire associé à l'HTAP. Les CML-AP de patients HTAP présentent une surexpression du transporteur de la sérotonine (5-HTT ou SERT), un phénomène important pour expliquer leur hyper-prolifération dans la maladie (Eddahibi, Humbert et al. 2001; Eddahibi, Humbert et al. 2002). De même, il a clairement été noté que les CML-AP en fonction des différents territoires vasculaires présentent à leur surface des distributions de canaux potassiques très différentes (Archer, Huang et al. 1996; Coppock and Tamkun 2001). Par exemple, les CML-AP distales présentent plus de canaux potassiques voltage-dépendant Kv1.5 que les CML-AP proximales. Les CML-AP isolées à partir de patients souffrant d'HTAP conservent également *in vitro* certaines de ces caractéristiques et représentent également de bons outils d'étude pour la maladie (Eddahibi, Humbert et al. 2001; Guignabert, Raffestin et al. 2005; Guignabert, Tu et al. 2009).

4.1.3 Les Fibroblastes Pulmonaires des Parois Vasculaires

Le rôle et l'importance des fibroblastes pulmonaires des parois vasculaires, essentiellement présents dans l'adventice, restent très obscurs mais pourraient s'apparenter à celui des CML-AP. Les fibroblastes sont connus pour leur faciliter à proliférer, à migrer et à synthétiser de grandes quantités de composés matriciels. D'autre part, plusieurs hypothèses suggèrent que les CE pulmonaires et/ou les CML-AP pourraient se dédifférencier et se rapprocher d'un phénotype pro-fibroblastique et ainsi participer au remodelage artériel pulmonaire (Stenmark and Frid 1998). Dans l'HTAP hypoxique, les fibroblastes ont été retrouvés comme étant l'un des premiers types cellulaires à proliférer et à synthétiser des composés matriciels (Stenmark, Gerasimovskaya et al. 2002). De plus, les fibroblastes par leurs synthèses actives de plusieurs protéases comme la MMP-2 et MMP-9 faciliteraient la migration cellulaire dans la paroi vasculaire (Lepetit, Eddahibi et al. 2005) et la mise en place de la néo-vascularisation de la *vasa vasorum* présente dans de nombreuses formes d'HTAP (Gambaryan, Perros et al. 2010; Gambaryan, Perros et al. 2011; Montani, Perros et al. 2011; Gambaryan, Cohen-Kaminsky et al. 2012). La formation de ces vaisseaux adventiciels pourrait être une voie d'accès pour les cellules progénitrices et ainsi contribuer à l'épaississement de la média et de l'adventice vasculaire (Davie, Crossno et al. 2004; Gambaryan, Cohen-Kaminsky et al. 2012).

4.1.4 Les Cellules Inflammatoires

Ces dernières années, le rôle clé de l'inflammation et de l'auto-immunité, comme étant au moins un stimulus amplificateur et aggravant des lésions vasculaires dans l'HTAP, a été clairement mis en évidence. Une forte augmentation de la synthèse et du relargage de différentes cytokines cruciales, un recrutement actif de cellules immunitaires au niveau péri-vasculaire et des anomalies fonctionnelles de ces cellules immunitaires ont pu être mis en évidence (Figure 5) (Hassoun, Mouthon et al. 2009; Kherbeck, Tamby et al. 2011; Schermuly, Ghofrani et al. 2011; Tamosiuniene, Tian et al. 2011; Huertas, Tu et al. 2012; Price, Wort et al. 2012).

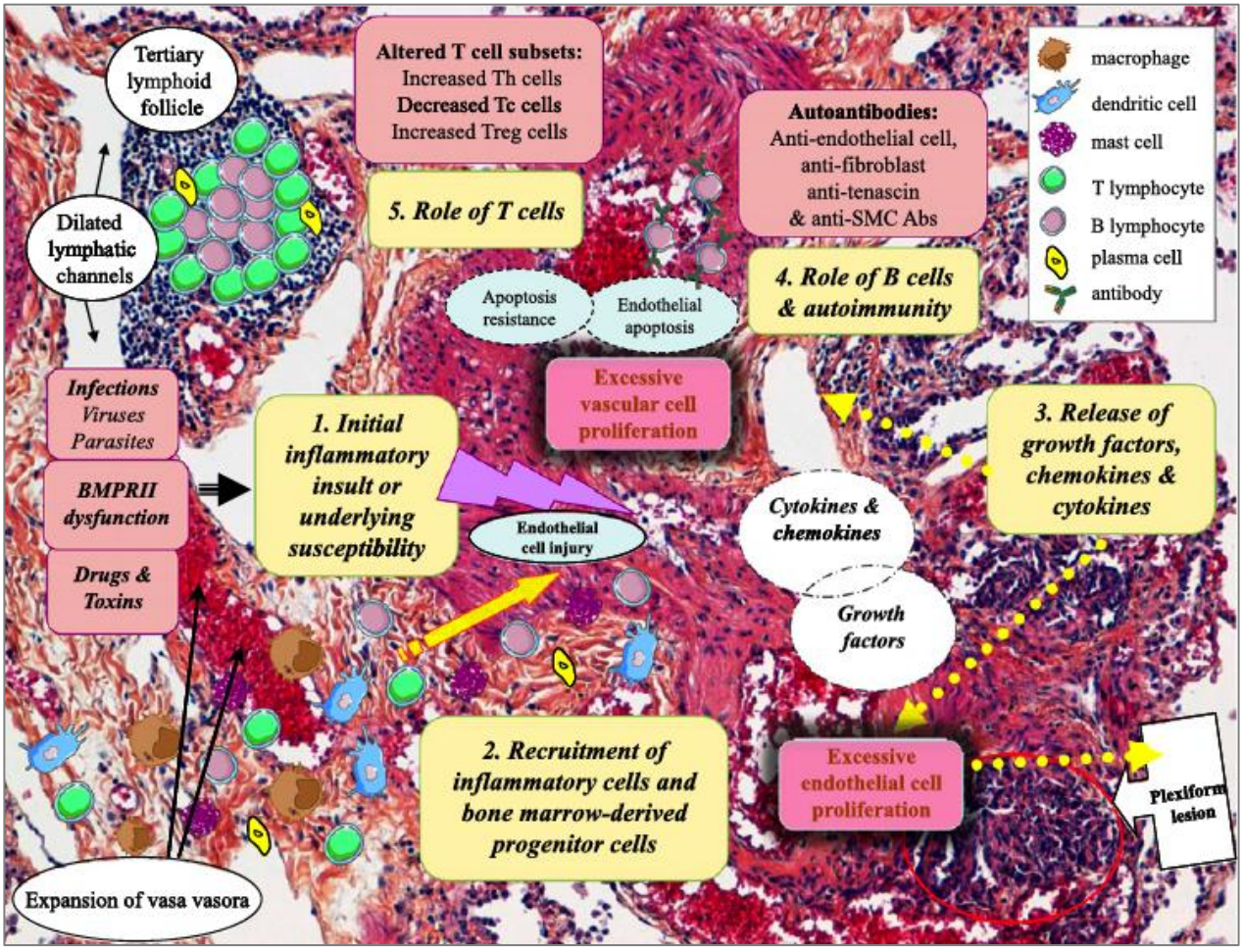


FIGURE 5 : Schéma résumant les différents aspects du rôle clé joué par l'inflammation et l'auto-immunité dans la physiopathologie de l'HP. (Price, Wort et al. 2012)

Dans toutes les formes humaines ou expérimentales d'HP, on retrouve des niveaux anormalement élevés de plusieurs cytokines et chemokines clefs comme par exemple, l'IL-1β, l'IL-6, le MCP-1, la fractalkine, l'IL-13 et le facteur MIF (facteur d'inhibition de la migration). Certaines de ces anomalies sembleraient même corréler avec la gravité de quelques formes

d'HP (Soon, Holmes et al. 2010; Montani, Humbert et al. 2011). De plus, il a été démontré : d'une part que la surexpression d'IL-6 chez des souris transgéniques est à l'origine d'un remodelage artériel pulmonaire et cause une HP spontanée (Steiner, Syrkina et al. 2009), et d'autre part sa déficience protège contre le développement de la maladie (Savale, Tu et al. 2009). Dans certaines formes sévères d'HP, comme l'HP associées au lupus érythémateux, les traitements immunosuppresseurs ont montré certains effets bénéfiques, soulignant l'importance de la composante inflammatoire chez ces patients (Sanchez, Sitbon et al. 2006). De plus, des recrutements péri-vasculaires de cellules inflammatoires sont souvent rencontrés dans les lésions vasculaires humaines et expérimentales, incluant entre autres, des macrophages, des cellules dendritiques, des lymphocytes de types T et B ainsi que des cellules mastocytaires (Taraseviciene-Stewart, Nicolls et al. 2007; Hoffmann, Yin et al. 2011). De plus, il a été mis en évidence la présence de certains auto-anticorps circulants, dont des anticorps anti-nucléaires, des anticorps dirigés contre les CE et les fibroblates (Morse, Antohi et al. 2000; Tamby, Chanseaud et al. 2005; Terrier, Tamby et al. 2008). Des structures très particulières appelées « foyers d'inflammation chronique ou tissu lymphoïde tertiaire » ont même été récemment décrites dans les stades tardifs de la maladie par notre groupe (Perros, Dorfmuller et al. 2012). On retrouve également des anomalies fonctionnelles importantes des certaines cellules inflammatoires, dont les cellules T régulatrices qui normalement protègent l'endothélium et les vaisseaux contre les agressions (Tamosiuniene, Tian et al. 2011; Huertas, Tu et al. 2012). Il a également été montré que l'inflammation pulmonaire d'origine allergique augmente la sensibilité vasculaire pulmonaire à la sérotonine, au thromboxane, à l'angiotensine II et à l'ET-1 (Witzenrath, Ahrens et al. 2006; Daley, Emson et al. 2008; Mushaben, Hershey et al. 2012). L'inflammation pourrait donc favoriser l'HTAP chez des sujets prédisposés, en augmentant la réactivité du lit vasculaire pulmonaire. Cependant, à ce jour, aucuns outils thérapeutiques ne visent réellement directement à corriger ces anomalies et des travaux supplémentaires sont donc requis.

4.1.5 Les Plaquettes

Les lésions thrombotiques et le dysfonctionnement des plaquettes semblent être également importants dans le développement de l'HP (Herve, Humbert et al. 2001). En effet, la formation anormale de thrombus serait due et aggravée par des anomalies de la cascade de la coagulation, des CE et/ou des plaquettes. Les anomalies vasculaires, plus particulièrement au niveau de l'endothélium chez les patients HP peuvent conduire à une libération plaquettaire de différents facteurs pro-coagulants, vaso-actifs ou mitogènes (Pietra, Edwards et al. 1989; Johnson, Granton et al. 2006; White, Meoli et al. 2007). Les plaquettes sont en effet très riches

en un grand panel de différents facteurs pro-prolifératifs, vaso-conctricteurs et pro-fibrosants : on retrouve par exemple de la sérotonine, du glutamate, du thromboxane A2, du PDGF, du TGF-β et du VEGF. Une diminution de la numération des plaquettes et une augmentation de l'activité plaquettaire sont retrouvées dans différentes formes d'HP humaine (Herve, Humbert et al. 2001). Il est probable que l'hypercoagulabilité et les microthromboses *in situ* contribuent à la progression de la maladie. Cependant, dans la plupart des cas, on ignore si la thrombose et les anomalies plaquettaires sont des causes ou des conséquences de l'HTAP (Herve, Humbert et al. 2001). Les rats « fawn-hooded rat (FHR) » qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la sérotonine dans les plaquettes développent lentement une HP et étaye fortement cette hypothèse (Sato, Webb et al. 1992). La thérapie par anti-coagulants semblerait améliorer la survie chez les patients HTAPi bien que des études supplémentaires soient encore nécessaires pour valider l'ensemble de ces données (Fuster, Steele et al. 1984).

4.1.6 Les Cellules Progénitrices

Le rôle des cellules progénétrices dans l'HTAP reste à élucider, car les données actuelles restent controversées et requièrent des études supplémentaires. Des essais de thérapie génique à l'aide de cellules endothéliales progénitrices (EPC) autologues programmées pour sur-exprimer la eNOS sont en cours d'évaluation dans un essai clinique. Les EPC ont été choisies dans cet essai clinique car elles représentaient une catégorie de cellules progénitrices prometteuses. Cependant, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) pourraient être tout aussi intéressantes du fait de leur multipotence et de leur tendance à s'accumuler aux niveaux de sites lésés et inflammés (Ozawa, Sato et al. 2008; Myers, Granero-Molto et al. 2010). Par conséquent, la compréhension des mécanismes de différenciation est requise pour développer de nouveaux outils et de potentielles stratégies dans le traitement de l'HP.

4.2 Aspects Moléculaires

La physiopathologie de l'HTAP est complexe et multifactorielle. Néanmoins, ces dernières années ont vu des progrès significatifs non seulement dans l'identification des différentes voies de signalisation impliquées, que dans l'identification de potentielles cibles pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

4.2.1 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans le Contrôle du Tonus Vasculaire

Des défauts majeurs du tonus vasculaire ont été identifiés dans l'HTAP et sont traités dans le chapitre « Dysfonction endothéliale et HTAP » page 51.

4.2.2 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans la Prolifération et la Survie Cellulaire

Plusieurs facteurs et voies de signalisation sont impliqués dans la prolifération et migration anormale ainsi que dans la survie cellulaire associée à l'HP comprenant entre autres : des facteurs de croissance (platelet-derived growth factor ou PDGF, epidermal growth factor ou EGF, fibroblast growth factor ou FGF), des cytokines et chemokines (IL-1, IL-6, ou monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1 ou CCL2)) et d'autres molécules comme les protéines morphogéniques osseuses (BMP). Ces molécules exercent leurs effets par fixation à des récepteurs présentant soit une activité tyrosines kinase (RTK) ou une activité serine/thréonine kinase et par la transduction d'un signal mitogène. Plusieurs anomalies d'expression ou d'activité de ces différents récepteurs ainsi que des défauts dans la transmission du signal ont pu être mises en évidence et impliquées dans ces phénomènes d'hyper-prolifération et de résistance à l'apoptose (Humbert, Monti et al. 1995; Du, Sullivan et al. 2003; Benisty, McLaughlin et al. 2004; Takahashi, Goto et al. 2006; Perros, Montani et al. 2008; Dahal, Cornitescu et al. 2010; Reynolds, Holmes et al. 2012).

4.2.2.1 Voie de Signalisation du Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

La famille du PDGF forme une famille de facteurs de croissance homodimériques (PDGF-A, -B, -C et –D) ou hétérodimériques (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC et -DD). Cet assemblage se produit de manière intracellulaire juste avant leur libération. Au contraire des formes PDGF-AA, -AB, -BB qui sont directement actives suite à leur sécrétion, les formes PDGF-CC et –DD doivent perdre leur domaine CUB (complément C1r/C1s, Uegf, Bmp1) avant de devenir actives. Il existe trois récepteurs différents qui résultent de la combinaison de deux sous-unités -α et -β suite à la liaison d'un des ligands : PDGFR-αα, PDGFR-αβ et PDGFR-ββ. Des différences d'affinité ligand/récepteur existent : le PDGF-AA ne se fixe que sur le PDGFR-αα, tandis que le PDGF-BB est le seul à se lier de manière équivalente à toutes les formes de récepteurs avec une haute affinité ; Le PDGF-AB et –CC peuvent assembler et activer les récepteurs PDGFR-αα, PDGFR-αβ ; le PDGF-DD active avec haute affinité le PDGFR-ββ et avec une moindre efficacité le récepteur PDGFR-αβ (Figure 6). Chaque PDGFR est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. Quand il est activé, les récepteurs se dimérisent,

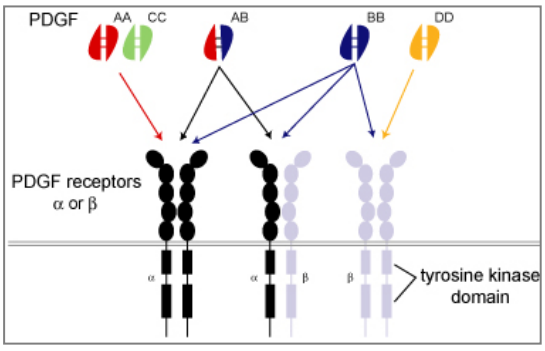


***FIGURE 6** : La famille de facteurs PDGF et ses récepteurs*

et s'auto-phosphorylent, suivi ensuite d'une activation en cascade des autres protéines cytoplasmiques pour la transmission du signal intracellulaire. Une fois activés, les récepteurs sont internalisés et leur fonction protéine kinase inhibée, ce qui assure un rétrocontrôle et permet une régulation précise de la réponse au stimulus. Le PDGF stimule la prolifération cellulaire et possède un fort pouvoir chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles, fibroblastes, CML et CE (Tanabe, Saito et al. 2000; Berk 2001; Yamboliev and Gerthoffer 2001; Raines 2004). De plus, le PDGF est considéré comme un facteur pro-angiogénique ayant également des effets stimulateurs sur les péricytes et les CML, cellules indispensables à la stabilisation des vaisseaux néoformés (Carmeliet 2005).

Balasubramaniam *et al.* (Balasubramaniam, Le Cras et al. 2003) ont été les premiers à noter une surabondance de PDGF dans l'HP intra-utérine chronique provoquée par la ligature du canal artériel et à évoquer le possible rôle de cette voie dans la maladie. Cette hypothèse a pu être validée par l'équipe de Schermuly *et al.* (Schermuly, Dony et al. 2005), qui ont montré que l'imatinib, un antagoniste du PDGFR, réduit le développement de la maladie dans les modèles animaux d'HP induit par l'administration de monocrotaline ou l'exposition à l'hypoxie chronique. Dans ces mêmes travaux, une surexpression protéique du PDGFR-β avait pu également être notée dans des homogénats pulmonaires de patients HTAP. Cependant, la preuve d'anomalies de cette voie a pu être clairement mise en évidence par Perros *et al.* (Perros, Montani et al. 2008). Dans les tissus humains d'artères pulmonaires micro-disséqués de patients HTAPi, une surexpression des ARNm codant pour le PDGF-A, PDGF-B, PDGFR-α, and PDGFR-β a pu être notée. De même, l'augmentation protéique du PDGFR-β a pu être validée ainsi qu'une activation anormale du récepteur PDGFR-β dans les lésions vasculaires. Récemment, des données ont pu également montrer que la sérotonine internalisée par sont transporteur 5-HTT pouvait trans-activer le PDGFR-β, un phénomène important dans la prolifération des CML-AP au cours du remodelage artériel pulmonaire HTAP (Ren, Watts et al.).

4.2.2.2 Voie de Signalisation du Fibroblast Growth Factor (FGF)

La famille des FGF forme un groupe d'au moins 23 membres qui sont fortement conservés au cours de l'évolution et exprimés de manière ubiquitaire. Il s'agit de polypeptides d'environ 150 acides aminés, synthétisés par les fibroblastes, les CE et CML. Ils agissent sur une famille de 4 récepteurs spécifiques de haute affinité : FGFR-1, -2, -3 et -4 (Figure 7). Les FGF se lient à leur récepteur par l'intermédiaire d'héparane sulfate protéoglycanes (protéines associées à la matrice extracellulaire et modifiées par l'addition d'héparane sulfate). Lors de la liaison d'un des ligands, une dimérisation du récepteur se produit suivie d'activation tyrosine kinase par trans-autophosphorylation qui déclenche le signal mitogènique (Figure 8).

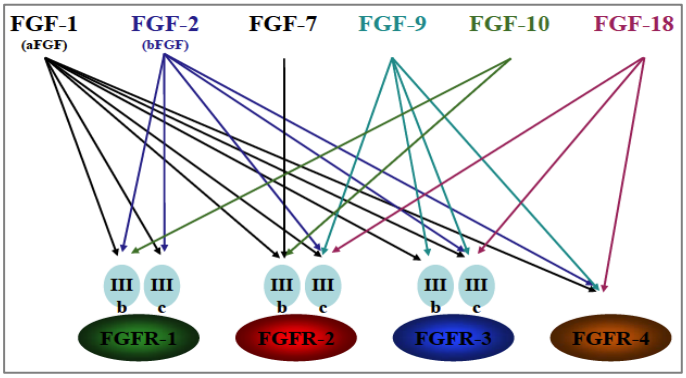


FIGURE 7 : La famille de facteurs FGF et ses récepteurs

De part de ses effets pléiotropiques allant de la prolifération, la survie, la migration, l'induction de la production de composés de la MEC à la différenciation et l'angiogenèse (Goncalves 1998), le FGF2 a suscité beaucoup d'intérêt dans l'HP. Sa synthèse par les cellules vasculaires pulmonaires est induite par l'exposition à l'hypoxie et le *shear stress* (Quinn, Schlueter et al. 2002; Li, Oparil et al. 2003). Les niveaux sériques et pulmonaires de FGF2 sont anormalement élevés aussi bien dans les modèles animaux d'HP que dans l'HP humaine. En effet, une élévation de 51% du taux circulant et de 21% du taux urinaire de FGF2 est retrouvé chez les patients HTAPi en comparaison à une population contrôle (Benisty, McLaughlin et al. 2004). De plus, cette surabondance de FGF2 a pu être retrouvée dans les 2 modèles

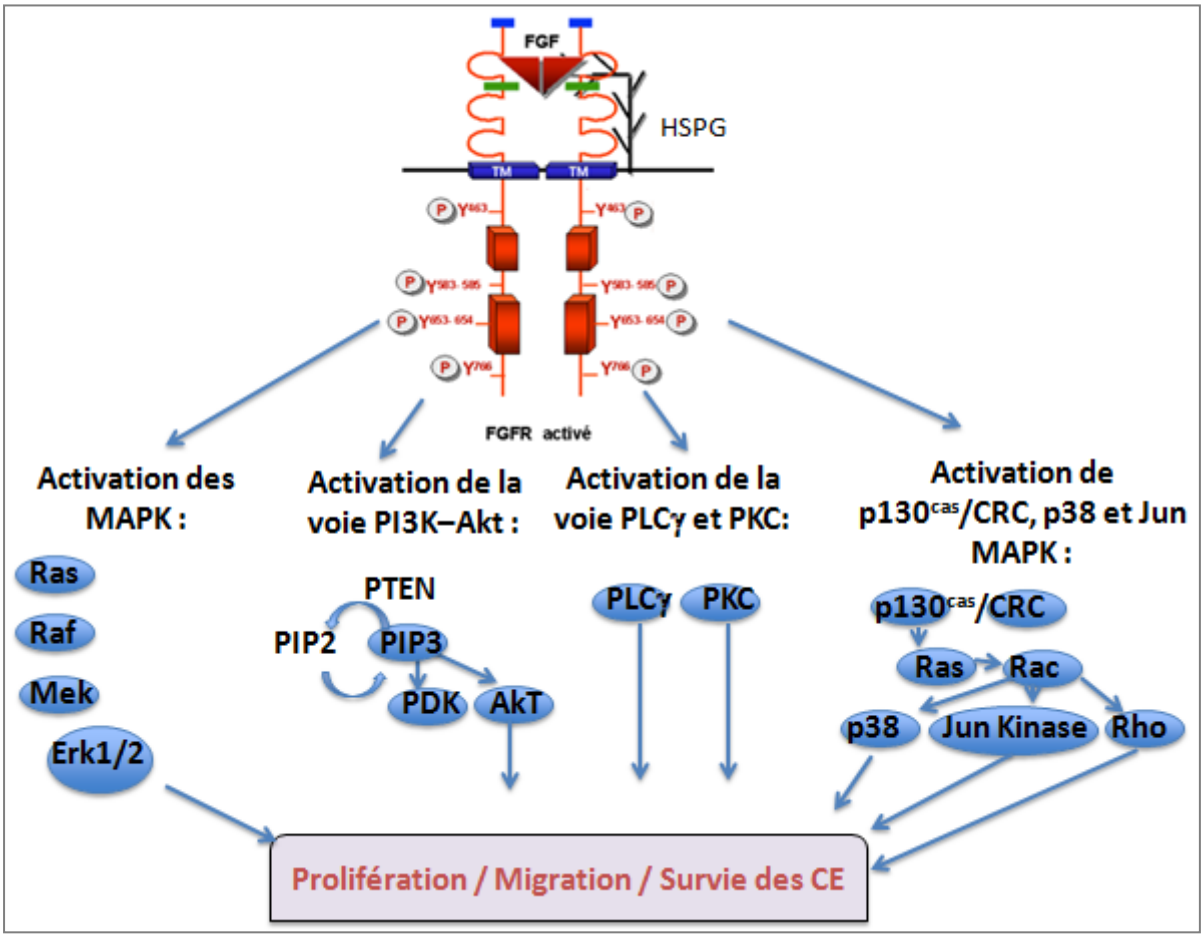


FIGURE 8 : Voie de signalisation de FGF2. L'auto-phosphorylation des récepteurs initie la cascade d'activation de différentes voies pour aboutir à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire.

expérimentaux d'HP : shunt aorto-pulmonaire chez l'agneau (Wedgwood, Devol et al. 2007) et administration de monocrotaline (Arcot, Fagerland et al. 1995; Izikki, Guignabert et al. 2009). Notre équipe a également pu montrer que le FGF2 était surproduit par les CE-HTAP aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, et que cette anomalie jouait un rôle déterminant dans l'hyperplasie du muscle lisse et dans l'acquisition d'un phénotype anormal de la CE (Izikki, Guignabert et al. 2009; Tu, Dewachter et al. 2011). De plus, le FGF2 peut être séquestré et stocké localement dans le réseau de MEC et être relargué en grande quantité lors des phénomènes de remodelage matriciel (Benezra, Vlodavsky et al. 1993; Thompson and Rabinovitch 1996; Buczek-Thomas and Nugent 1999; George, Johnson et al. 2001).

4.2.2.3 Voie de Signalisation de l'Epidermal Growth Factor (EGF)

La famille des facteurs EGF est constituée de l'EGF, du facteur de croissance transformant-α (TGF-α), de l'heparin-binding EGF-like (HB-EGF), de l'épiréguline, de l'amphiréguline (AR), de l'épigène, de la bêta-celluline (BTC), et de la neuréguline -1, -2, -3 et -4. Il existe quatre types de récepteurs de l'EGF (EGFR), comprenant l'**ErbB1**, aussi appelé EGFR ou HER1, l'**ErbB2** (Neu/Her2), l'**ErbB3** (HER3), et l'**ErbB4** (HER4) (Figure 9). Ces récepteurs de l'EGF ont un domaine de liaison pour le ligand dans le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Chaque ligand peut se lier à un même récepteur, mais des affinités de liaison différentes sont observées. L'EGF, HB-EGF, le TGF-α, AR, la BTC, et l'épiréguline sont capables de se lier à ErbB1. L'HB-EGF, l'épiréguline, et la BTC sont connus pour se lier à ErbB4 ainsi que ErbB1. Les neurégulines sont des ligands pour ErbB3 et ErbB4. Lors de liaison au ligand, des monomères EGFR se dimérisent et une autophosphorylation dans le domaine intracellulaire se produit, conduisant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires.

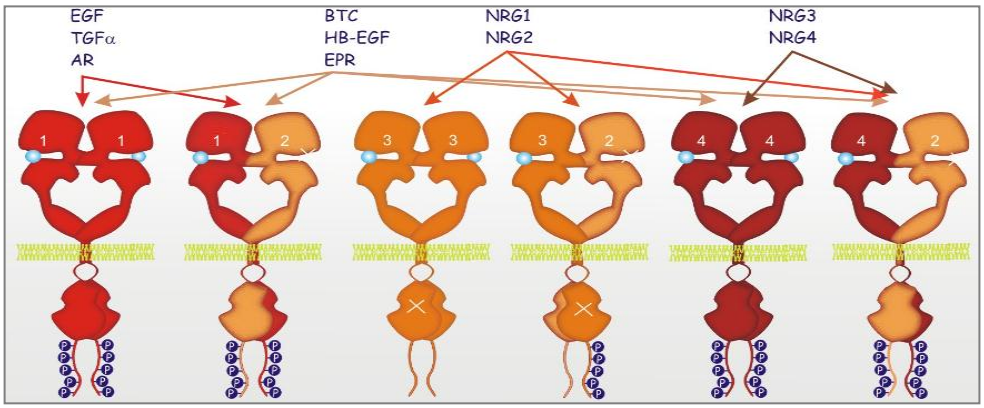


***FIGURE 9** : La famille de facteurs de l'EGF et ses récepteurs*

Plusieurs éléments suggèrent que le système de signalisation EGF contribue à la réponse proliférative des CML et qu'il pourrait être impliqué dans l'initiation et/ ou la progression du remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP. Plusieurs études ont démontré que l'EGF se co-localisait avec la ténascine-C, un composé de la MEC présent abondamment dans les lésions obstructives des patients HTAP et qu'ainsi il conduirait à une prolifération et à une migration des cellules vasculaires (Jones, Cowan et al. 1997; Jones, Crack et al. 1997; Cowan, Jones et al. 1999; Jones, Jones et al. 1999; Cowan, Jones et al. 2000). Ce rôle pathogène de la signalisation de l'EGF est renforcé par les données obtenues dans divers modèles animaux. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant le TGF-α sous le contrôle du promoteur de la protéine *Surfactant humaine SP-C* (les souris TGF-alpha) développent une HTAP sévère et présentent un remodelage vasculaire caractéristique avec une muscularisation anormale des petites artères pulmonaires (Le Cras, Hardie et al. 2003). De plus, ce phénotype HTAP est redevenu normal avec une souris double transgénique exprimant à la fois le TGF-α et un récepteur EGF muté, négatif-dominant sous le contrôle du même promoteur SP-C. Par ailleurs, Merklinger *et al.* (Merklinger, Jones et al. 2005) ont montré que l'inhibition de l'EGFR par PKI166, un inhibiteur des récepteurs EGFR et Her2, améliore le phénotype et la survie des rats HTAP induite par l'injection de monocrotaline via l'induction de l'apoptose des CML-AP. Cependant, Dahal BK *et al.* (Dahal, Cornitescu et al. 2010) n'ont pu noté aucun changement dans les niveaux d'ARNm codant pour les protéines CTB, AR, HB-EGF, ErbB1, ErbB2, ErbB3, et ErbB4 ou dans les niveaux de protéines d'ErbB1 dans les tissus de patients HTAPi (au moins dans les stades tardifs de la maladie) par rapport à des tissus sains. Dans cette même étude, Dahal BK *et al.* ont constaté que trois antagonistes EGFR cliniquement approuvés (gefitinib, erlotinib, et le lapatinib) réduisent considérablement la prolifération induite par l'EGF sur des CML-AP isolées de rats sains ou de ceux qui ont de la monocrotaline (Dahal, Cornitescu et al. 2010). Il est à noter que dans ce modèle, le niveau de protéines ou d'ARNm de l'EGF, de TGF-α, des récepteurs ErbB1, ErbB2 et ErbB3 sont augmentés significativement dans les homogénats pulmonaires. En revanche, aucune différence n'a été notée concernant les niveaux de l'ARNm codant pour l'HB-EGF, l'épiréguline, l'AR, et l'ErbB4. Ils ont également constaté que le traitement quotidien de rats avec le gefitinib et l'erlotinib (mais avec le lapatinib), commencé trois semaines après l'injection sous-cutanée de monocrotaline, ont un effet curatif et régresse sensiblement l'HTAP établie. Par contre, ces effets bénéfiques du traitement par le gefitinib ou l'erlotinib n'ont pas été retrouvés dans le modèle murin hypoxique chronique. Ces résultats discordants peuvent être justifiés par des différences dans les espèces, la gravité de la maladie, les mécanismes sous-jacents d'induction de la pathologie ou par une complexité du réseau de signalisation intracellulaire beaucoup plus grande. En effet, une signalisation coopérative et synergique existe entre l'EGF et d'autres facteurs, y compris avec le TGF-β1 et FGF2 (Kelvin,

Simard et al. 1989; Ciccolini and Svendsen 1998; Park, Kim et al. 2000; Murillo, del Castillo et al. 2005; Ding, Shi et al. 2007; Grouf, Throm et al. 2007; Uttamsingh, Bao et al. 2008).

4.2.2.4 Voie de Signalisation du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

La famille des VEGF (Figure 10) comprend le facteur de croissance placentaire (PLGF), le VEGF-A, -B, -C, le -D et -E. Le VEGF en se liant à ses récepteurs de type tyrosine kinase de haute affinité (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4) est impliqué dans le nombreux processus biologiques et plus particulièrement au niveau des CE. Le VEGF est indispensable pour la formation du lit vasculaire pendant l'embryogenèse. Les souris transgéniques déficientes en VEGF ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire avec une vasculogenèse anormale du cœur et des vaisseaux (Carmeliet, Ferreira et al. 1996). La voie VEGF/VEGFR est impliquée dans la prolifération de CE, la synthèse du NO et de prostacycline, l'angiogenèse et le contrôle de la perméabilité vasculaire (Dimmeler and Zeiher 1999; He, Venema et al. 1999; Nagy, Dvorak et al. 2012). Chez les patients HTAPi, l'expression du VEGF et du VEGFR-2 est accrue dans les vaisseaux pulmonaires et dans les lésions plexiformes (Cool, Kennedy et al. 1997; Geiger, Berger et al. 2000; Tuder, Chacon et al. 2001; Voelkel, Vandivier et al. 2006) : le VEGF étant plus abondant au niveau du muscle lisse et le VEGFR-2 au niveau de l'endothélium. Le VEGFR-1 est principalement exprimé dans les CE des vaisseaux pulmonaires adjacents aux lésions plexiformes (Hirose, Hosoda et al. 2000). Le contenu plaquettaire en VEGF des patients HTAPi est également augmenté par rapport aux sujets témoins (Eddahibi, Humbert et al. 2000). Les données obtenues au travers des modèles animaux sont beaucoup moins claires et soulèvent plusieurs interrogations. L'expression pulmonaire du VEGF est augmentée dans le modèle d'HTAP induite par hypoxie chronique chez le rat (Christou, Yoshida et al. 1998; Laudi, Steudel et al. 2007), mais c'est plutôt une diminution de l'expression du VEGF qui a été montrée dans les poumons des rats présentant une HTAP induite par l'injection de monocrotaline (Partovian, Adnot et al. 1998). La

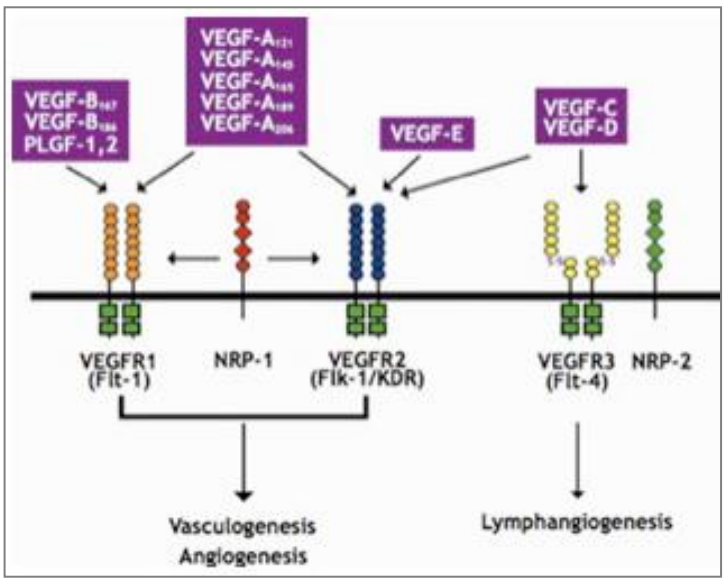


FIGURE 10 : *La famille de facteurs de VEGF et ses récepteurs*

surexpression du VEGF protège de l'HTAP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Partovian, Adnot et al. 2000; Louzier, Raffestin et al. 2003) et par injection de monocrotaline (Campbell, Zhao et al. 2001). L'expression du VEGF et de son récepteur VEGFR-2 est également augmentée dans deux autres modèles d'HTAP : un modèle d'HTAP sur défaillance cardiaque induite par overpacing chez le chien (Ray, Mathieu et al. 2008) et le modèle d'HTAP induite chez les porcelets avec un shunt cardiaque (Rondelet, Kerbaul et al. 2003). Dans le cœur droit, l'expression du VEGF est accrue dans le modèle hypoxique alors qu'elle est diminuée dans le modèle par injection de monocrotaline (Partovian, Adnot et al. 1998).
Les isoformes VEGF-A et B sont largement étudiées dans l'HTAP et un rôle protecteur leur ait attribué (Partovian, Adnot et al. 2000; Campbell, Zhao et al. 2001; Louzier, Raffestin et al. 2003). Dans le modèle d'HP induite par la monocrotaline, une thérapie cellulaire sur-exprimant le VEGF-A protège contre le développement de la maladie. Dans le modèle d'HP induite par exposition de rats à une hypoxie chronique, Louzier *et al.* ont montré que la surexpression de VEGF-B à l'aide d'adénovirus est également protecteur. Cependant, les souris déficientes en VEGF-B ont une susceptibilité au développement de l'HP hypoxique identique aux souris sauvages. Ces données expérimentales suggèrent que le VEGF ne jouerait pas un rôle central dans le développement de la maladie mais qu'il pourrait être utile pour limiter sa progression (Louzier, Raffestin et al. 2003). D'autre part, l'association du blocage du VEGFR-2 (SU5416) et de l'hypoxie chronique induit une dysfonction endothéliale, associée à une mort cellulaire permettant de sélectionner un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose parmi les CE des artères pulmonaires. La conséquence de ce traitement est le développement d'une HTAP sévère (Taraseviciene-Stewart, Kasahara et al. 2001). Ces résultats présentent l'apoptose des CE comme l'origine d'une susceptibilité au développement des maladies vasculaires (Taraseviciene-Stewart, Kasahara et al. 2001; Sakao, Taraseviciene-Stewart et al. 2007).

4.2.2.3 Voie de Signalisation de la Sérotonine (5-HT)

La sérotonine, encore appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine, synthétisée par les cellules entérochromaffines du tube digestif, par les neurones sérotoninergiques et les CE pulmonaires. Elle est fabriquée à partir du tryptophane qui est d'abord convertit en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par l'enzyme tryptophane hydroxylase TPH. Le 5-HTP est ensuite transformé en 5-HT par la 5-HTP décarboxylase. Dans la circulation sanguine, la 5-HT est activement capturée et stockée dans les plaquettes et explique les taux faibles circulants (Nilsson, Ericson et al. 1985; Vanhoutte 1991; Brenner, Harney et al. 2007). La principale voie d'inactivation de la 5-HT est la désamination oxydative assurée par les monoamines oxydases (ou MAO) avec la formation d'acide 5-hydroxy-indol-acétique (ou 5HIAA).

La sérotonine agit soit au travers d'un transporteur membranaire (le 5-HTT ou SERT) qui l'internalise dans la cellule, soit au travers de récepteurs membranaires spécifiques (5-HTR). On connaît au moins 14 gènes codant les 5-HTR classifiés en 7 familles : 5-HT1A-E, P, 5-HT2A-C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 et 5-HT7. Le système sérotoninergique est particulièrement important pour l'hyperplasie du muscle lisse, la vasoconstriction et la microthrombose *in situ*.

Le système sérotoninergique a longtemps été suspecté comme participant activement à la progression de la maladie et à son initiation. En effet, les taux plasmatiques de 5-HT sont anormalement élevés chez les patients HTAP et reste élevés même après transplantation pulmonaire, suggérant que cette anomalie n'est pas une conséquence de la maladie (Herve, Launay et al. 1995). Le 5-HTT est surexprimé dans les CML-AP HTAP *in situ* et *in vitro* et corrèle avec la sévérité de la maladie (Eddahibi, Humbert et al. 2001; Eddahibi, Humbert et al. 2002; Marcos, Fadel et al. 2004; Marcos, Fadel et al. 2005). La TPH est elle-même également surexprimée dans les CE pulmonaires de patients HTAPi (Eddahibi, Guignabert et al. 2006). Des défauts de stockage en 5-HT ou une consommation excessive de plaquettes par le poumon pourraient mener au développement de la maladie (Herve, Drouet et al. 1990; Herve, Launay et al. 1995; Breuer, Georgaraki et al. 1996; Eddahibi, Humbert et al. 2000; Kereveur, Callebert et al. 2000; Morecroft, Loughlin et al. 2005). D'autre part, les anorexigènes, fenfluramine et dexfenfluramine, ont été associés à un plus grand risque de développement de la maladie (Douglas, Munro et al. 1981; Gurtner 1985; Loogen, Worth et al. 1985; Brenot, Herve et al. 1993; Abenhaim, Moride et al. 1996; Perros, Montani et al. 2008). De plus, des phénomènes de sérotonylation de RhoA ont pu être mis en évidence, un phénomène impliqué dans l'activation constitutive de la voie Rho/ROCK (Guilluy, Eddahibi et al. 2009). Enfin, des liens directs entre le 5-HTT et l'expression/ activité des Kv1.5 ont émergé (Guignabert, Izikki et al. 2006; Guignabert, Tu et al. 2009; Guignabert 2011).

Les modèles animaux d'HP ont pu renforcer et aider à mieux comprendre le rôle du système sérotoninergique. En effet, les rongeurs exposés aux anorexigènes (Eddahibi, Raffestin et al. 1998), à la monocrotaline ou exposés à l'hypoxie chronique possèdent des taux élevés de 5-HT circulante. L'infusion chronique de 5-HT à l'aide de pompes osmotiques permet également de renforcer la gravité de l'HP induite par l'hypoxie (Eddahibi, Raffestin et al. 1997). Les souris déficientes en BMPR-II sont également plus sensibles à l'infusion de 5-HT (Long, MacLean et al. 2006). Les rats « fawn-hooded rat » qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la sérotonine dans les plaquettes développent lentement une HP (Sato, Webb et al. 1992). Ces rats FHR possèdent également des niveaux de 5-HTT plus élevés que des animaux témoins (Sato, Webb et al. 1992; Morecroft, Loughlin et al. 2005). De plus, les rats sur-exprimant l'angiopoiétine-1 synthétisent plus de 5-HT et développent un phénotype HP (Sullivan, Du et al.

2003). Cette augmentation de 5-HTT est aussi retrouvée de manière très précoce avant même les modifications des paramètres hémodynamiques dans le modèle monocrotaline, suggérant un rôle central du 5-HTT dans la maladie (Guignabert, Raffestin et al. 2005). D'ailleurs les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (comme la Fluoxetine) protègent et régressent l'HP induite par la monocrotaline (Wang, Han et al. ; Marcos, Adnot et al. 2003; Guignabert, Raffestin et al. 2005; Jiang, Tidwell et al. 2007; Guignabert, Tu et al. 2009; Zhai, Zhang et al. 2009; Zhu, Mao et al. 2009). Les souris transgéniques déficientes en 5-HTT sont protégées contre le développement de l'HP induite par l'hypoxie chronique (Eddahibi, Hanoun et al. 2000). Ceci est également vrai pour les souris déficientes en TPH (Izikki, Hanoun et al. 2007). Enfin, des évidences directes de son rôle dans la maladie sont venues de la démonstration que la surexpression du 5-HTT induisait un phénotype d'HP spontanée chez la souris : 1) souris SM22 5-HTT+ sur-exprimant le 5-HTT sélectivement dans les CML sous le contrôle du promoteur SM22 (Guignabert, Izikki et al. 2006) (Figure 11) ; 2) souris SERT+ sur-exprimant de manière ubiquitaire le 5-HTT grâce à une construction de type « *yeast artificial chromosome* » (YAC) (MacLean, Deuchar et al. 2004).

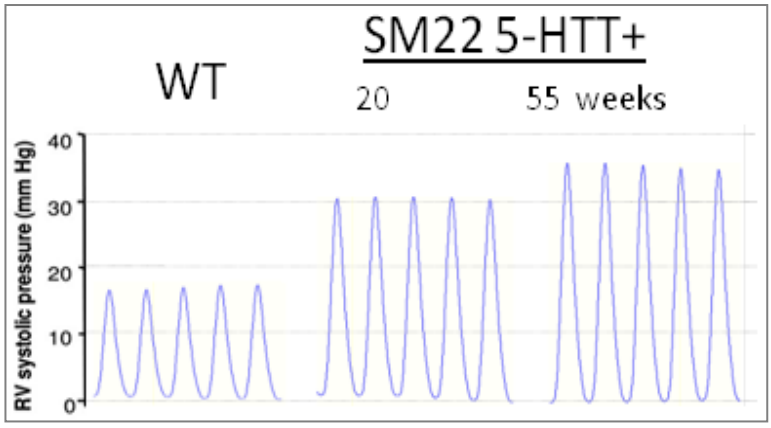


FIGURE 11 : *Courbe de pression systolique du ventricule droit chez les souris sauvages (WT) et les souris sur-exprimant le 5-HTT au niveau de muscle lisse à la 20ème ou 55ème semaine d'âge.*

Des quatorze récepteurs 5-HTR, le 5-HT-2A, -2B et -1B semblent particulièrement intéressants dans la maladie. De fortes expressions des récepteurs 5-HT-1B, -2A, et -2B ont pu être notées par l'immunohistochimie dans les artères pulmonaires de patients HTAPi (Marcos, Fadel et al. 2005). De plus, des liens étroits entre le 5-HTT et les 5-HTR ont pu être mis en évidence et encouragent des études supplémentaires pour mieux comprendre ce réseau complexe (Lawrie, Spiekerkoetter et al. 2005; Launay, Schneider et al. 2006). L'inhibition du 5-HT2A inhibe le remodelage artériel pulmonaire et l'HP induite par la monocrotaline pyrrole chez la souris (Hironaka, Hongo et al. 2003) et la vasoconstriction induite par la 5-HT chez des rats sains ou exposés à l'hypoxie (Morecroft, Loughlin et al. 2005; Cogolludo, Moreno et al. 2006). Cependant des effets systémiques ont été reporté avec la kétanserine (un inhibiteur sélectif du 5-HT2B) qui limite son utilisation dans l'HP (Frishman, Huberfeld et al. 1995). Les souris

déficientes en 5-HT2B sont protégées contre le développement de la maladie et l'administration d'un inhibiteur 5-HT2B (RS-127445) limite le développement de la maladie dans le modèle hypoxique (Launay, Herve et al. 2002). D'autre part, il aurait été démontré que le 5-HT2B contrôle les niveaux de 5-HT circulante (Callebert, Esteve et al. 2006), et cette perte de fonction prédisposerait au développement de la maladie par les fenfluramines (Blanpain, Le Poul et al. 2003). Des inhibiteurs à plus large d'action 5-HT2A/5-HT2B sont aussi efficaces et permettent de protéger contre le développement de l'HP induite par la monocrotaline chez le rat (Dumitrascu, Kulcke et al.). Le 5-HT1B est impliqué dans la vasoconstriction des artères pulmonaires (Morecroft, Heeley et al. 1999) et dans le développement de l'HP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Keegan, Morecroft et al. 2001). Récemment, Morecroft *et al.* ont pu montrer que la co-inhibition du récepteur 5-HT-1B et du 5-HTT avec le LY393558 serait plus effective dans la prévention et réversion de la maladie ce qui ouvre un nouveau champ d'exploration de ces molécules.

4.2.2.4 Autres voies de Signalisation Emergentes

Plusieurs autres études ont également obtenues quelques évidences supportant le rôle d'autres facteurs de croissance pour l'HTAP, dont : le *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) (Lee, Byun et al. 2005), le *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (Ono, Sawa et al. 2004; Ono, Sawa et al. 2004; Hiramine, Sata et al. 2011), le *Nerve Growth Factor* (NGF) (Ieda, Fukuda et al. 2004; Kimura, Ieda et al. 2007) et le *Placenta Growth Factor* (PIGF) (Sundaram, Tailor et al. 2010; Sands, Howell et al. 2011).

4.2.3 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans le Remodelage Matriciel

Le remodelage de la MEC ainsi que de la membrane basale par des enzymes comme les MMP représente plus qu'un simple remodelage qui supprime la barrière physique qui sépare les cellules et tout ce qui les entoure. En effet, cette modification de la MEC permet de générer des signaux par la libération de molécules séquestrées (Mueller and Fusenig 2004). Plusieurs protéases remodèlent la MEC et plusieurs de ces acteurs sont anormalement abondants et/ou actifs dans l'HP. En effet, plusieurs évidences révèlent des déséquilibres de balance protéolytiques en faveur des activités élastinolytiques (Rabinovitch 1999; Kim, Haghighat et al. 2011), gélatinolytiques (Lepetit, Eddahibi et al. 2005) et collagénolytiques (Lepetit, Eddahibi et al. 2005; George, Sun et al. 2012). De plus, des surabondances de chymase (Mitani, Ueda et al. 1999), de tryptase (Kwapiszewska, Markart et al. 2012) et des anomalies du système *tissue plasminogen activator (tPA)–plasmine* et du système *urokinase plasminogen activator* (uPA) – *plasmine* ont été mises en évidence dans l'HTAP (Huber, Beckmann et al. 1994; Christ, Graf et

al. 2001; Katta, Vadapalli et al. 2008; Kouri, Queisser et al. 2008). L'ensemble de ces activités protéasiques excessives est connu pour entraîner le clivage de plusieurs composés de la MEC comme par exemple la laminine et la fibronectine, conduisant donc à une stimulation du remodelage (Duffy 2002). De nombreux autres facteurs sont présents dans la MEC et sont libérés au cours de son remodelage, comme par exemple, le FGF2, l'IGF, le TGF-β, la 5-HT (Rabinovitch 2001; Ma, Han et al. 2011; Wei, Warburton et al. 2012). Les inhibiteurs de l'élastase ont montré une réelle efficacité contre la progression de l'HP dans les modèles animaux (Ilkiw, Todorovich-Hunter et al. 1989; Maruyama, Ye et al. 1991; Cowan, Jones et al. 1999; Cowan, Heilbut et al. 2000; Cowan, Jones et al. 2000). De manière similaire, des effets bénéfiques des inhibiteurs des MMP ont été retrouvés dans le modèle monocrotaline (Vieillard-Baron, Frisdal et al. 2003). En revanche, l'inhibition des MMP par la doxycycline ou la surexpression d'un inhibiteur naturel des MMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP)-1) à l'aide d'un adénovirus s'est avérée délétère dans le modèle d'hypoxie chronique (Vieillard-Baron, Frisdal et al. 2000). Ces derniers résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des mécanismes physiopathologiques différents entre modèles animaux et des études plus approfondies sont requises.

4.2.4 Les Acteurs Moléculaires de l'Inflammation et de l'Auto-immunité

Une observation commune des spécimens histo-pathologiques et analyses biologiques de différentes formes d'HP est la présence plus ou moins importante d'une "inflammation." L'inflammation est définie comme une série complexe d'interactions entre les facteurs solubles et les cellules qui peuvent survenir à une réponse traumatique, infectieuse, post-ischémique, accident toxique, ou auto-immune. En effet, il est bien reconnu que les processus inflammatoires tels que ceux-ci est de promouvoir le développement et la progression de la maladie vasculaire systémique (Raines and Ferri 2005; Zernecke and Weber 2005; Schober 2008). Cette composante inflammatoire est également présente dans la plupart des HP expérimentales. Il est aussi bien reconnu que les médiateurs inflammatoires que les cellules immunes sont impliqués dans la progression de la maladie. En effet, les patients HTAP ont des niveaux sériques élevés de cytokines, y compris de l'IL-1-β, IL-6 et IL-8 (Humbert, Monti et al. 1995; Soon, Holmes et al. 2010; Montani, Humbert et al. 2011) et de chemokines telles que la chemokine (CC motif) ligand (CCL)2/MCP-1 (Sanchez, Marcos et al. 2007), CCL5 (RANTES) et CXC3CL1/fractalkine (Balabanian, Foussat et al. 2002; Dorfmuller, Zarka et al. 2002). Ces données suggèrent que les niveaux accrus de ces médiateurs sont communs à la pathologie en soi et ne sont pas limités à un sous-type particulier. En plus de ces facteurs circulants, des cellules immunitaires comme des cellules dendritiques, des cellules B et T et/ ou des fibrocytes

sont recrutés au niveau des vaisseaux remodelés (Le Pavec, Perros et al. 2009; Montani, Perros et al. 2011).

4.2.4.1 L'interleukine-6 (IL-6)

L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle de 21 à 28kDa en fonction de sa glycosilation. Elle est produite par plusieurs types cellulaires comprenant entre autres : les fibroblastes, adipocytes les CE, les macrophages (Akira, Taga et al. 1993). Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions telles que la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse et la différenciation (Culig, Steiner et al. 2005). Le récepteur à l'IL-6 est une protéine de 80 kDa qui lie la cytokine avec une faible affinité. La présence d'une autre glycoprotéine de 130 kDa (gp130) qui elle ne lie pas l'IL-6 libre est nécessaire pour que le récepteur de l'IL-6 lie la cytokine avec une haute affinité. La dimérisation des domaines intracellulaires de deux gp130 active la voie JAK qui ensuite active la protéine STAT spécifique de la voie.

Les concentrations plasmatiques de l'IL-6 sont élevées dans l'HTAP, et elles sont corrélées avec la sévérité de la maladie et à une mortalité accrue. Chez les patients atteints de la sclérodermie, le niveau élevé en IL-6 circulants prédit la présence d'association avec l'HP (Gourh, Arnett et al. 2009). L'élévation des taux sériques en IL-6 sont aussi en corrélation avec la sévérité en terme d'hémodynamique chez les patients atteints de l'HP associée à une BPCO (Eddahibi, Chaouat et al. 2006). Le niveau d'IL-6 au niveau pulmonaire est également augmenté dans les modèles expérimentaux. Cette augmentation est liée à une production importante des cellules inflammatoires mais aussi des cellules vasculaires (Miyata, Sakuma et al. 1995; Savale, Tu et al. 2009). L'IL-6 a de nombreux effets sur les cellules inflammatoires et vasculaires qui peuvent favoriser le remodelage vasculaire (Akira, Taga et al. 1993; Culig, Steiner et al. 2005). Ceux-ci comprennent l'accumulation de lymphocytes T péri-vasculaires, la stimulation de la CE pour produire des chemokines, la prolifération des CML et des CE (Imaizumi, Yoshida et al. 2004). De plus, les souris transgéniques sur-exprimant l'IL-6 développent spontanément l'HTAP avec une prolifération des cellules vasculaires et une expansion de cellules T (Steiner, Syrkina et al. 2009). En cohérence avec ces résultats, les souris déficientes en IL-6 sont protégées contre l'HTAP induite par une hypoxie chronique (Savale, Tu et al. 2009).

4.2.4.2 L'interleukine-1 (IL-1)β

L'IL-1β est une puissante cytokine pro-inflammatoire. Le taux sérique est augmenté chez les patients HTAP et ceci est corrélé avec un mauvais pronostic (Soon, Holmes et al. 2010). L'IL-1β est produit en grande quantité dans le modèle monocrotaline, par rapport au modèle chronique

hypoxique. En outre, un traitement répété avec un antagoniste des récepteurs IL-1R réduit la pression ainsi que l'hypertrophie du ventricule droit dans le modèle monocrotaline, mais pas dans l'hypoxie chronique (Voelkel, Tuder et al. 1994).

4.2.4.3 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

Le MCP-1 (CCL2) est une chemokine produite par les cellules vasculaires qui active et induit une migration des monocytes ou des macrophages par l'intermédiaire d'actions avec les récepteurs chemokines à motif (CC motif). Des niveaux élevés de MCP-1 sont retrouvés dans le plasma et les poumons des patients HTAP (Sanchez, Marcos et al. 2007), bien qu'ils ne soient pas corrélés avec la sévérité de la maladie. De plus, il est noté que les CE et les CML produisent en quantité importante de MCP-1 surtout des cellules isolées issues des patients HTAP. De même, les CML des patients HTAP expriment plus de récepteurs pour MCP-1 et ont une réponse exagérée dans la migration et la prolifération cellulaire et que l'utilisation des anticorps neutralisants bloque ces effets.

4.2.4.4 RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)

RANTES (ou CCL5) est une chemokine qui médie le recrutement et le homing des lymphocytes T, des monocytes, des basophiles, des monocytes, des éosinophiles et des cellules Natural killers par le biais des différents récepteurs de chemokines. L'ARNm de RANTES au niveau pulmonaire est élevée chez les patients atteints d'HTAP et surtout au niveau des CE. Pour l'instant, il n'y a pas eu de nouvelles études sur RANTES dans l'HTAP et les mécanismes supplémentaires restent à élucider (Dorfmuller, Zarka et al. 2002).

4.2.4.5 Fractalkine (CX3CL1)

La fractalkine (CX3CL1) est une chemokine exprimée sous une forme soluble ou une forme liée à la membrane, dont les effets sont médiés par le récepteur chemokine CX3CR1 exprimé par de nombreux types cellulaires. Des niveaux élevés de fractalkine soluble sont observés chez les patients HTAP. La fractalkine est régulée positivement sur les deux CD4+ et CD8+ lymphocytes T dans l'HTAP, et il est probable que l'augmentation de l'expression de CX3CR1 au niveau des CML-AP des patients HTAP contribue au recrutement péri-vasculaire de cellules inflammatoires. La fractalkine a également été montré pour induire la prolifération des CML-AP isolées de rats (Balabanian, Foussat et al. 2002; Perros, Dorfmuller et al. 2007). Les thérapies ciblant spécifiquement les médiateurs de l'inflammation sont indéniablement d'un grand intérêt. Cependant, ils n'ont pas encore été testés chez l'homme.

4.2.4.6 Rôle des Cellules B et des Auto-Anticorps

Les cellules B produisent des anticorps spécifiques des épitopes antigéniques. Les niveaux d'anticorps antinucléaires sont augmentés chez les patients HTAP (Rich, Kieras et al. 1986) et des auto-anticorps dirigés contre les CE et les fibroblastes ont été décrits (Tamby, Chanseaud et al. 2005; Tamby, Humbert et al. 2006). Ces auto-anticorps peuvent jouer un rôle en induisant l'expression des molécules d'adhérence ou en induisant l'apoptose des CE et participer ainsi à l'émergence du phénotype résistant à l'apoptose des CE-HTAP (Carvalho, Savage et al. 1996; Bordron, Dueymes et al. 1998). Plus récemment, il a été décrit que des IgG des patients HTAP peuvent se lier aux CML-AP et d'induire une contraction cellulaire (Bussone, Tamby et al. 2012).

4.2.5 Les Acteurs Moléculaires Impliqués dans les Changements Métaboliques

Contrairement à la cellule normale, qui dépend principalement de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour générer son énergie, la plupart des cellules cancéreuses et des cellules vasculaires pulmonaires HTAP utilisent la glycolyse même en présence d'oxygène. Ce phénomène de détournement métabolique a été décrit par Otto Warburg en 1924 et se nomme « effet Warburg ». Bien que moins efficace que la phosphorylation oxydative pour produire l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), la glycolyse aérobie semble toutefois avantageuse pour les cellules à fort pouvoir prolifératif. Ce paradoxe apparent a fait l'objet de très nombreux travaux ces dernières années (Michelakis, McMurtry et al. 2002; Bonnet, Michelakis et al. 2006; Bonnet, Archer et al. 2007; Archer, Gomberg-Maitland et al. 2008; Michelakis, Webster et al. 2008; Sutendra, Bonnet et al. 2010). En fait, l'effet Warburg faciliterait la captation et l'incorporation d'éléments nécessaires au renouvellement cellulaire (par exemple, les nucléotides, acides aminés et lipides) plutôt que le rendement énergétique. Cependant les mécanismes de ce shift métabolique sont méconnus. Dans les cellules cancéreuses, ce changement métabolique a été démontré comme étant sous le contrôle de plusieurs oncogènes et suppresseur de tumeur, incluant entre autres : *HIF* (Goda and Kanai 2012), *p53* (Gottlieb and Vousden 2010; Maddocks and Vousden 2011; Puzio-Kuter 2011), *E2F transcription factor 1* (Blanchet, Annicotte et al. 2011) et *PTEN* (ou Phosphatase and tensin homolog) (Garcia-Cao, Song et al. 2012). Grâce à l'utilisation de plusieurs stratégies, les effets bénéfiques de la restitution d'un métabolisme oxydatif contre le développement et la progression de l'HP ont pu être montrés : **(1)** premièrement, au travers de l'utilisation de la dichloroacétate (DCA), un inhibiteur de la *pyruvate déshydrogénase kinase mitochondriale* (PDK) (Michelakis, McMurtry et al. 2002; McMurtry, Bonnet et al. 2004; Michelakis, Webster et al. 2008; Guignabert, Tu et al. 2009). La PDK inhibe le *pyruvate dehydrogenase* (PDH) qui est l'enzyme responsable de l'oxydation du

pyruvate en acétyl-CoA, qui initie la phosphorylation oxydative par le cycle de Krebs. **(2)** deuxièmement, par inhibition de l'oxydation aérobie des acides gras (effet « Randle ») (Sutendra, Bonnet et al. 2010), qui est connu pour inhiber la phosphorylation oxydative par le cycle de Krebs. La prévention de ce shift métabolique semble être prometteuse pour prévenir le développement de la maladie mais requiert plus de travaux avant de pouvoir être testé chez l'Homme.

4.3 Aspects Génétiques et Environnementaux

4.3.1 Le Gène *BMPR-II*

4.3.1.1 Fonction Cellulaire et la Voie de Signalisation BMPR-II

Les ligands du récepteur BMPR-II, les BMP (*bone morphogenetic proteins*), sont des cytokines dont le rôle est de réguler la croissance, la différentiation et l'apoptose de divers types cellulaires, dont les CE et les CML. Les BMP ont également un rôle dans la différentiation cellulaire lors de l'embryogénèse, et dans le maintien et la réparation des tissus adultes. Un ligand BMP se lie à deux récepteurs de type 1 (ACVRL1, BMPR-IA, BMPR-IB, ActR-1a), entraînant leur hétéro-polymérisation avec deux récepteurs de type 2 (BMPR-II) (Figure 12). Ce complexe est stabilisé par une protéine accessoire endogline. Suite à cette hétéro-polymérisation, les récepteurs BMPR-II phosphorylent les récepteurs de type I, entraînant la phosphorylation de protéines cytoplasmiques appelées Smads (Smad1, Smad5, Smad8) (Figure 12). Ces protéines Smads s'associent alors à une protéine Smad4, et ce nouveau complexe est transloqué dans le noyau et module l'expression de gènes cibles.

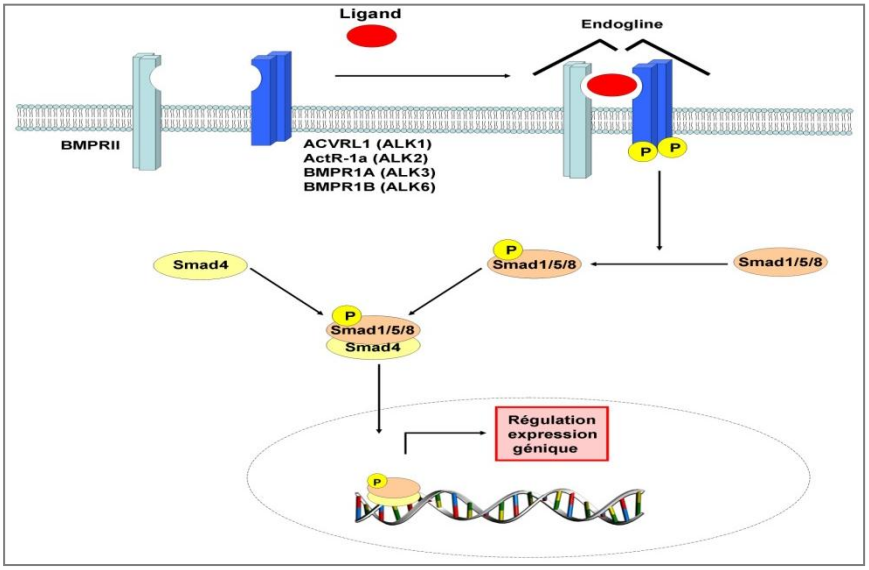


FIGURE 12 : *Schéma de la voie de signalisation du récepteur BMPR-II. La liaison d'un ligand (BMP2, 4, 7) sur le récepteur BMPR-II entraîne la phosphorylation d'un récepteur de type I (BMPR-IA, BMPR-IB, ACVRL1, ActR-1a), à l'origine de la phosphorylation de protéines cytoplasmiques Smads (Smad1, Smad5, Smad8) qui s'associent à une protéine Smad4 pour transloquer dans le noyau et moduler l'expression de gènes cibles*

Le récepteur BMPR-II est exprimé dans les CE pulmonaires et les macrophages, et dans une moindre mesure dans les CML et les fibroblastes. Il a été montré que l'expression pulmonaire de ce récepteur était diminuée chez les patients présentant une HTAP héritable ainsi que chez ceux présentant une HTAP idiopathique par rapport à des sujets sains (Atkinson, Stewart et al. 2002). Plusieurs groupes se sont ainsi intéressés à l'implication du gène *BMPR-II* et de ses mutations sur la dysfonction cellulaire observée dans l'HTAPi et l'HTAPh. Il a été observé que les CML-HTAP, ayant ou non une mutation du gène *BMPR-II,* ont une diminution de leur capacité à activer la voie des Smads 1/5 (Yang, Long et al. 2005). Ceci a pour conséquence une réduction de la capacité à inhiber la prolifération des CML, expliquant les lésions observées dans les artères pulmonaires des patients HTAPi ou HTAPh. De plus il a été montré qu'en réponse aux facteurs de croissance, les CE-HTAPi prolifèraient et migraient de manière plus importante que les CE de sujets contrôles (Masri, Xu et al. 2007). Enfin, les BMPs protégeraient les CE de l'apoptose (Teichert-Kuliszewska, Kutryk et al. 2006). En effet, il a été observé que les CE pulmonaires des souris KO pour le gène *BMPR-II*, étaient plus sensibles à l'apoptose. L'hypothèse émise est que le taux élevé d'apoptose dans l'endothélium favoriserait le développement de CE résistantes à l'apoptose, formant par la suite les lésions plexiformes caractéristiques de l'HTAP.

Les modèles animaux ont pu confirmer l'implication des mutations du gène *BMPR-II* dans le développement de l'HTAP. En effet, West *et al.* (West, Fagan et al. 2004) ont démontré le développement d'une HTAP chez les souris ayant une mutation du gène *BMPR-II* dans leurs CML. En effet, ces souris présentaient une augmentation des PAPm, un remodelage vasculaire et une hypertrophie ventriculaire droite. Plus récemment, Hong *et al*. (Hong, Lee et al. 2008) ont montré que les souris ayant une délétion du gène *BMPR-II* dans leurs CE, présentaient des lésions artérielles pulmonaires distales compatibles avec une HTAP. Néanmoins, aucun de ces modèles ne reproduit des formes d'HTAP sévères caractérisant les formes héritables de la maladie chez l'Homme.

4.3.1.2 Les mutations BMPR-II dans l'HTAP

Une origine génétique de l'HTAP a été suspectée en 1954 lorsque Dresdale a décrit la première forme familiale de la maladie (Dresdale, Michtom et al. 1954). Au cours des 50 années qui suivirent, de plus en plus de familles ont été décrites, et en 2006 dans le registre Français de l'HTAP, les HTAP évoluant dans un contexte familial représentaient 3.9% de l'ensemble des HTAP du groupe 1 (Humbert, Sitbon et al. 2006). L'étude des familles a permis de comprendre le mode de transmission des HTAPh, et ainsi en 1995 il était reconnu que l'HTAP se transmettait sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète (seuls 20%

des sujets porteurs d'une mutation développeront la maladie). Il est également suspecté un phénomène d'anticipation génétique, caractérisé par des âges de survenue de la maladie significativement moins élevés au fil des générations (Loyd, Butler et al. 1995). Cependant, aucune explication biomoléculaire n'explique celle observée dans l'HTAP à ce jour.

Les recherches du locus en cause dans l'HTAP ont été entreprises. En 1997, l'analyse des marqueurs microsatellites et les analyses de liaison génétique au sein des familles affectées par la maladie, ont permis aux équipes de Nichols et de Morse de localiser sur le bras long du chromosome 2, la région en cause dans l'HTAP (Morse, Jones et al. 1997; Nichols, Koller et al. 1997). L'analyse des gènes candidats a permis aux équipes de Lane et Deng d'identifier chez les sujets atteints de la maladie, des mutations germinales présentes à l'état hétérozygote sur le gène *BMPR-II* (Deng, Morse et al. 2000; Lane, Machado et al. 2000).

A l'heure actuelle, une mutation du gène *BMPR-II* est retrouvée chez 58 à 74% des patients ayant une histoire familiale d'HTAP et 3,5 à 40% des patients ayant une HTAP considérée comme idiopathique (Cogan, Pauciulo et al. 2006; Sztrymf, Coulet et al. 2008; Machado, Eickelberg et al. 2009; Girerd, Montani et al. 2010). Des mutations du gène *BMPR-II* ont été décrites dans l'ensemble des exons, exception faite de l'exon 13 (Figure 13). Les mutations retrouvées sont des mutations ponctuelles des exons ou des sites donneurs et accepteurs d'épissage (non-sens et faux-sens), des grands réarrangements et des mutations du promoteur. Elles sont présentes seulement à l'état hétérozygote, et les souris KO pour le gène *BMPR-II* ne sont pas viables et meurent avant la gastrulation (Beppu, Kawabata et al. 2000).

Deux études publiées par Rudarakanchana et Nishihara en 2002 (Nishihara, Watabe et al. 2002; Rudarakanchana, Flanagan et al. 2002) montrent que les mutations du gène *BMPR-II* interrompent la voie de signalisation des BMP/Smad de manière hétérogène. En effet, ces auteurs montrent qu'une substitution d'un résidu cystéine du domaine de fixation du ligand ou du domaine kinase diminue l'export du récepteur à la membrane cellulaire. Dans ce cas là, le phénotype malade est dû à une haplo-insuffisance. En revanche les gènes possédant des mutations ne touchant pas un résidu cystéine du domaine kinase, permettent la création d'une protéine capable d'atteindre la surface cellulaire mais ayant perdu la capacité de phosphoryler les récepteurs de type 1. Dans ce cas là, le phénotype malade est dû à un effet dominant négatif du récepteur muté sur le récepteur sauvage. De plus, les protéines codées par un gène *BMPR-II* ayant une mutation faux-sens de la région codant pour la queue cytoplasmique, sont capables d'atteindre la surface cellulaire mais sont déficientes pour activer la voie des Smads (Yu, Beppu et al. 2005).

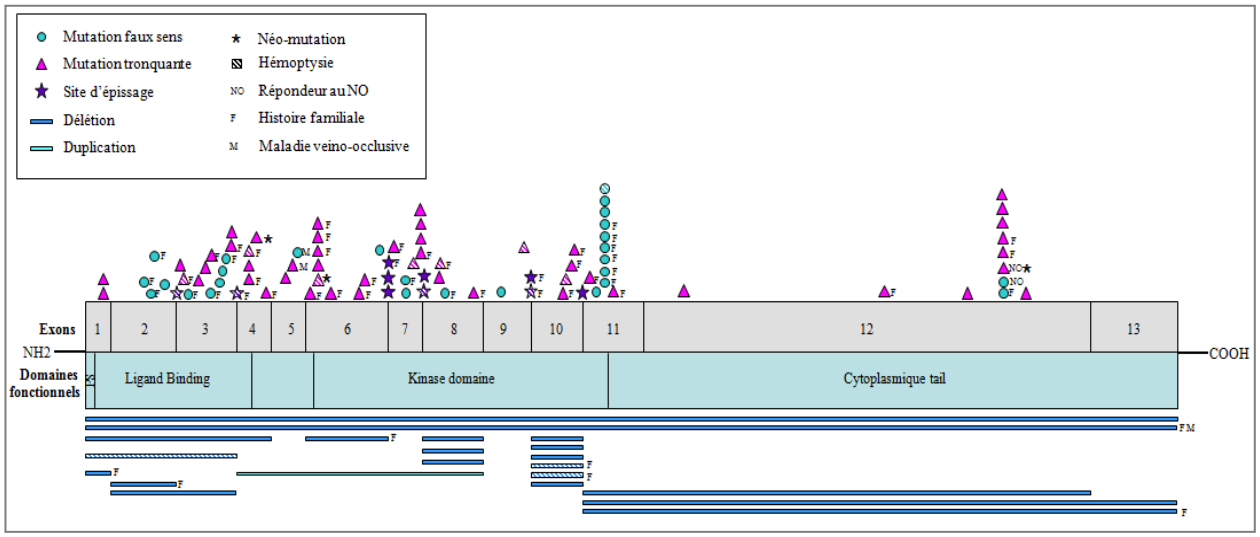


Figure 13 : *Localisation des mutations du gène BMPR-II identifiées chez les patients atteints d'HTAP suivis dans le Centre National de Référence de l'hypertension pulmonaire* La *Sévère*

pénétrance des mutations du gène *BMPR-II* est la fréquence d'apparition d'une HTAP chez les personnes porteuses d'une mutation de ce gène. Il est estimé que seuls 20% des porteurs de mutation du gène *BMPR-II* développent la maladie au cours de leur vie (Newman, Wheeler et al. 2001; Machado, Aldred et al. 2006). De plus, il a été montré par immuno-marquage que les CE des vaisseaux pulmonaires des sujets sains exprimaient le récepteur BMPR-II. En revanche, l'expression de ce récepteur est diminuée chez les patients atteints d'HTAPh, et dans une moindre mesure chez ceux atteints d'HTAPi (Atkinson, Stewart et al. 2002). Ces observations plaident en faveur du rôle joué par le récepteur BMPR-II dans le développement de la maladie, mais, même si une diminution de l'expression du récepteur BMPR-II est nécessaire, elle ne semble pas suffisante au développement d'une HTAP. D'autres facteurs, pouvant être génétiques ou environnementaux, contribueraient au développement de la maladie.

4.3.2 Les Autres Gènes Impliqués dans l'HTAP

4.3.2.1 Les gènes ACVRL1 et ENG

La maladie de Rendu-Osler (ou HHT pour *hereditary haemorrhagic telangiectasia*) est une dysplasie vasculaire caractérisée par des épistaxis, des télangiectasies et des malformations artério-veineuses en particulier pulmonaires, hépatiques ou cérébrales, des accidents vasculaires cérébraux et des abcès cérébraux. Les malformations artério-veineuses pulmonaires peuvent créer des shunts droit-gauches, provoquant une hypoxie, des embolies paradoxales, des accidents vasculaires cérébraux et des abcès cérébraux. Les patients atteints

de la maladie de Rendu-Osler peuvent développer une HTAP post-capillaire, en raison d'un état hyperkinétique aboutissant à une insuffisance cardiaque gauche. Cependant, l'HHT peut aussi être associée à des HTAP pré-capillaires qui sont histologiquement indiscernables des HTAPi. La maladie de Rendu-Osler est une maladie de transmission autosomique dominante, avec une pénétrance quasi complète à l'âge de 60 ans (97%). Plusieurs gènes ont été impliqués dans le développement de la maladie de Rendu-Osler, dont le gène *ACVRL1* (ou *ALK1*) localisé sur le chromosome 12, *ENG* localisé sur le chromosome 9, *MADH4* (ou *SMAD4 : Mothers against decapentaplegic homologue 4*, dont les mutations prédisposent aussi pour la polypose juvénile), et deux nouveaux loci (*HHT3* et *HHT4*) ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 7 respectivement. Récemment, l'association d'une HTAP et d'une maladie de Rendu-Osler a permis de mettre en évidence que les gènes *ACVRL1* et *ENG* appartenant à la famille des récepteurs du TGF-β au même titre que le gène *BMPR-II*, pouvaient être impliqués dans le développement de l'HTAP. Le gène *ACVRL1* code pour un récepteur de type I, tandis que le gène *ENG* code pour une protéine accessoire stabilisant la fixation du ligand sur les récepteurs. Les mutations de ces deux gènes sont toutefois peu fréquentes dans le cadre de l'HTAP alors qu'elles sont prédominantes dans la maladie de Rendu-Osler (Trembath, Thomson et al. 2001; Abdalla, Gallione et al. 2004; Chaouat, Coulet et al. 2004; Girerd, Montani et al. 2010).

4.3.2.2 Le gène Smad9

Le gène *Smad9* code pour la protéine Smad8 qui est une *receptor regulated Smads* (R-Smad), protéine régulée par les récepteurs de la famille du TGF-ß. Tout comme Smad1 et Smad5, la protéine Smad8 est phosphorylée par un récepteur de type I. Une fois phosphorylée, Smad8 s'associe avec une Co-Smad, Smad4 et ce complexe est transloqué dans le noyau où il régule la transcription de gènes cibles. Shintani *et al*. (Shintani, Yagi et al. 2009) ont décrit pour la première fois la présence d'une mutation non-sens du gène *Smad9* chez un patient atteint d'une HTAPi diagnostiquée à l'âge de 8ans. De plus, un contexte familial peut être suspecté. En effet, deux de ses frères et sœurs seraient décédés d'une maladie pulmonaire à l'âge de 2 et 13ans. Il est notable que le père du patient décrit par Shintani *et al*., bien que porteur de la mutation familiale du gène *Smad9,* était asymptomatique lors de l'étude, laissant supposer une pénétrance incomplète des mutations du gène *Smad9*. Des mutations de ce gène n'avaient jamais été reportées dans l'HTAP ou dans d'autres pathologies. Enfin, Huang *et al*. (Huang, Wang et al. 2009) ont souligné le rôle possible des mutations du gène *Smad9* dans le développement de l'HTAP, en démontrant que les souris porteuses d'une mutation du gène *Smad9* présentaient un remodelage vasculaire avec un épaississement de la média des artères pulmonaire distales.

Des mutations et des polymorphismes ont également été identifiés pour d'autres gènes impliqués dans le développement de l'HTAP, comme les récepteurs (5-HT2B), le transporteur de la sérotonine (5HTT) (Blanpain, Le Poul et al. 2003; Eddahibi, Chaouat et al. 2003; B, M et al. 2011), l'enzyme de conversion pour l'angiotensine (ACE) (Abraham, Raynolds et al. 2003) ou encore le canal potassique *Kv1.5* (Remillard, Tigno et al. 2007). Plus récemment, des études ont décrits des mutations de *Caveolin-1* (Austin, Ma et al. 2012). Et de manière intéressante, une étude a même décrit un remaniement chromosomique au niveau des cellules vasculaires (Aldred, Comhair et al. 2010).

4.3.3 Les Facteurs Environnementaux

Nous avons vu que des gènes sont associés au développement de l'HTAP mais ils ne semblent pas suffisants au développement d'une HTAP. D'autres facteurs, pouvant être ou environnementaux, contribueraient comme un « second hit » au développement de la maladie.

Il est maintenant reconnu que l'exposition à la dexfenfluramine est un facteur de risque d'HTAP. De manière intéressante, l'exposition à ces anorexigènes est plus courte chez les patients ayant une mutation du gène *BMPR-II* par rapport aux sujets chez lesquels aucune mutation n'a été identifiée. Cette observation pourrait indiquer que les sujets porteurs d'une mutation du gène *BMPR-II* ont un risque plus important de développer une HTAP suite à la prise d'anorexigènes (Humbert, Deng et al. 2002).

Plusieurs études sont en faveur de l'implication de facteurs génétiques additionnels dans le développement de l'HTAPi et HTAPh. Hamid *et al*. ont montré une diminution de l'expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR-II* chez les patients affectés par la maladie et porteurs d'une mutation du gène *BMPR-II,* par rapport aux personnes non atteintes mais porteuses d'une mutation *BMPR-II* (Hamid, Cogan et al. 2009). Ainsi, une faible expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR-II* serait associée au développement clinique de la maladie. Un mécanisme post-transcriptionnel par micro-RNA (miRNA), ARN simple brin se fixant spécifiquement à un ARN messager (ARNm) pour guider sa dégradation, a été suspecté pour être impliqué dans la diminution de l'expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR-II*. En effet, dans une première étude, Qin *et al*. (Qin, Zhao et al. 2009; Selimovic, Bergh et al. 2009) ont montré la reconnaissance de l'ARNm du gène *BMPR-II* par le miRNA miR-21, et ont montré une corrélation inverse entre le taux de BMPR-II et le taux de miR-21. De la même manière, Brock *et al*. (Brock, Trenkmann et al. 2009) ont montré l'implication des miRNA miR-17/92 dans la reconnaissance et la dégradation des

ARNm du gène *BMPR-II*, et ont montré que ces miR-17/92 étaient régulés par l'IL-6, cytokine incriminée dans le développement de l'HTAP.

Le métabolisme des œstrogènes, puissant mitogène des CML, a également été incriminé dans le développement de la maladie. En effet, l'enzyme cytochrome P450 1B1 (CYP1B1), qui est exprimée dans les poumons, particulièrement par les CE, et dont la diminution entraîne une augmentation de la concentration des œstrogènes, est diminuée chez les patientes atteintes d'HTAP porteuses de mutation du gène *BMPR-II*, alors que son taux est normal chez les femmes non atteintes porteuses d'une mutation *BMPR-II*. Austin *et al*. (Austin, Cogan et al. 2009) ont démontré une pénétrance 4 fois supérieure des mutations du gène *BMPR-II* chez les personnes porteuses à l'état homozygote du polymorphisme Asn453Ser du gène *CYP1B1*.

D'autres facteurs environnementaux semblent également impliqués dans la survenue et le développement de l'HTAP. Des études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'implication de la consommation de certains anorexigènes dans le risque de développer une HTAP. L'aminorex (Gurtner 1985) et plus récemment la fenfluramine/dexfenfluramine, (Abenhaim, Moride et al. 1996), le Benflorex ou le Dasatinib (Montani, Bergot et al. 2012; Savale, Chaumais et al. 2012) ont été incriminés. Les facteurs de susceptibilité individuelle jouent aussi un rôle important, lié entre autres à la vitesse de métabolisation du dérivé (Higenbottam, Marriott et al. 1999). En effet, le risque absolu dans la population générale est relativement faible. La proportion d'individus développant une HTAP parmi tous les individus ayant consommé de la fenfluramine ou ses dérivés est estimé à 1/10 000 pour une consommation de 12 mois (Abenhaim, Moride et al. 1996; Rich, Rubin et al. 2000). Cette proportion est probablement encore plus faible pour les patients ayant eu une exposition plus courte.

4.4 Modèles animaux d'HTAP

Un modèle animal a été défini par l'« *American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging* » comme étant un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain. Leur utilisation en recherche biomédicale est essentielle non seulement pour l'étude et la compréhension de la physiopathologie de maladie, mais également pour l'évaluation de la tolérance et de l'efficacité des traitements. Cependant leur utilisation doit être effectuée avec prudence puisqu'il ne s'agit que de modèles qui ne reflètent que partiellement les lésions et anomalies humaines et car les différences inter-espèces limitent très souvent les données ainsi obtenues.

Un bon modèle animal d'étude de l'HTAP devrait réunir idéalement un ensemble de caractéristiques comprenant entre autres :

- une évolution progressive/chronique et sévère ;
- des atteintes structurelles et fonctionnelles des artérioles pulmonaires résistives (<500µm) avec un remodelage intense associé à une hypertrophie médiale, des nécroses fibrinoïdes, des micro-thromboses et des lésions de type plexiforme ;
- une inflammation chronique avec des infiltrations péri-vasculaires ;
- des anomalies biologiques du même ordre que chez l'Homme : diminution des voies de signalisation du NO, de la prostacycline, du BMPR-II, et augmentation de la production d'ET-1, de facteurs de croissance clés comme PDGF, FGF2, EGF, 5-HT;
- Une réponse similaire aux traitements.

Plusieurs modèles animaux de la maladie ont été développés et ont permis d'importants progrès aussi bien dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTAP que dans la maîtrise et le développement de différentes molécules (Naeije and Dewachter 2007; Stenmark, Meyrick et al. 2009; Ryan, Bloch et al. 2011). Cependant, ces modèles animaux restent largement imparfaits et actuellement des efforts importants sont entrepris pour développer de nouveaux modèles encore plus proches de la maladie. En attendant et pour pallier le manque de modèle animal idéal pour l'HTAP, la plupart des équipes de recherche associe plusieurs modèles animaux différents dans leur études pour valider leurs observations.

4.4.1 Hypertension Pulmonaire induite par la Monocrotaline chez le Rat

La mise en place de ce modèle consiste en l'administration unique sous-cutanée de monocrotaline à la dose de 60mg/kg chez le rat avec un suivi sur 3 à 4 semaines. La monocrotaline est un alcaloïde de la famille de la pyrolizidine (Figure 11) qui se trouve dans les tiges, feuilles et graines de *crotalaria spectabilis,* une plante à floraison annuelle distribuée dans les régions tropicales et sous-tropicales, et introduite aux États-Unis en 1924 (Kay, Smith et al. 1969).



FIGURE 13 : *Crotalaria spectabilis et la molécule Monocrotaline*

Le modèle d'HP induite par la monocrotaline est un des modèles classiques d'étude de la maladie car l'HP expérimentale induite ressemble à la forme humaine de par sa gravité hémodynamique et histopathologie, et de par sa mortalité naturelle particulièrement élevée. Cependant, cette HP expérimentale diffère de l'HTAP par sa forte composante inflammatoire, la présence d'anomalies multi-organes avec une toxicité hépatique majeure, une perte précoce de la barrière endothéliale, une évolution très rapide sur quelques semaines et l'absence de lésions plexiformes.

Une augmentation significative des PAPm (Figure 14) est constatée dès la deuxième semaine suivant l'administration de cette drogue qui s'aggrave très rapidement (chez des rats de 100-150g : 30 à 50mmHg à la $3^{ème}/4^{ème}$ semaine contre 16-18mmHg chez des rats contrôle). Une importante hypertrophie ventriculaire droite (Figure 14), avec doublement de l'indice de Fulton est constatée. Dès la fin de la $3^{ème}/4^{ème}$ semaine suivant l'injection de monocrotaline une importante mortalité est souvent notée. D'importantes variations existent en fonction du lot et de l'âge des animaux utilisés, sachant que des animaux jeunes développent des HP plus sévères que des animaux plus âgés.

Le(s) mécanisme(s) précis de la mise en place de cette HP expérimentale reste encore très obscur (Gomez-Arroyo, Farkas et al. 2012). Il serait admis que la monocrotaline est tout d'abord métabolisée dans le foie par les cytochromes P450 en monocrotaline pyrrole (MCTP), qui serait le métabolite actif responsable des lésions vasculaires pulmonaires et du développement de l'HP expérimentale. Le fait que les souris ne peuvent convertir la monocrotaline en MCTP expliquerait pourquoi l'administration de monocrotaline chez la souris ne conduit pas au développement de la maladie comme chez le rat. Les métabolites actifs de la monocrotaline seraient donc ensuite à l'origine d'atteintes et/ou nécroses endothéliales accompagnées d'un œdème pulmonaire visible les deux premières semaines après l'injection. La résolution de cet

œdème en présence d'une forte inflammation péri-vasculaire ferait au remodelage progressif des artérioles pulmonaires (Figure 14) et à l'installation d'une défaillance cardiaque droite. Cependant de grandes pièces de ce puzzle restent encore mystérieuses.

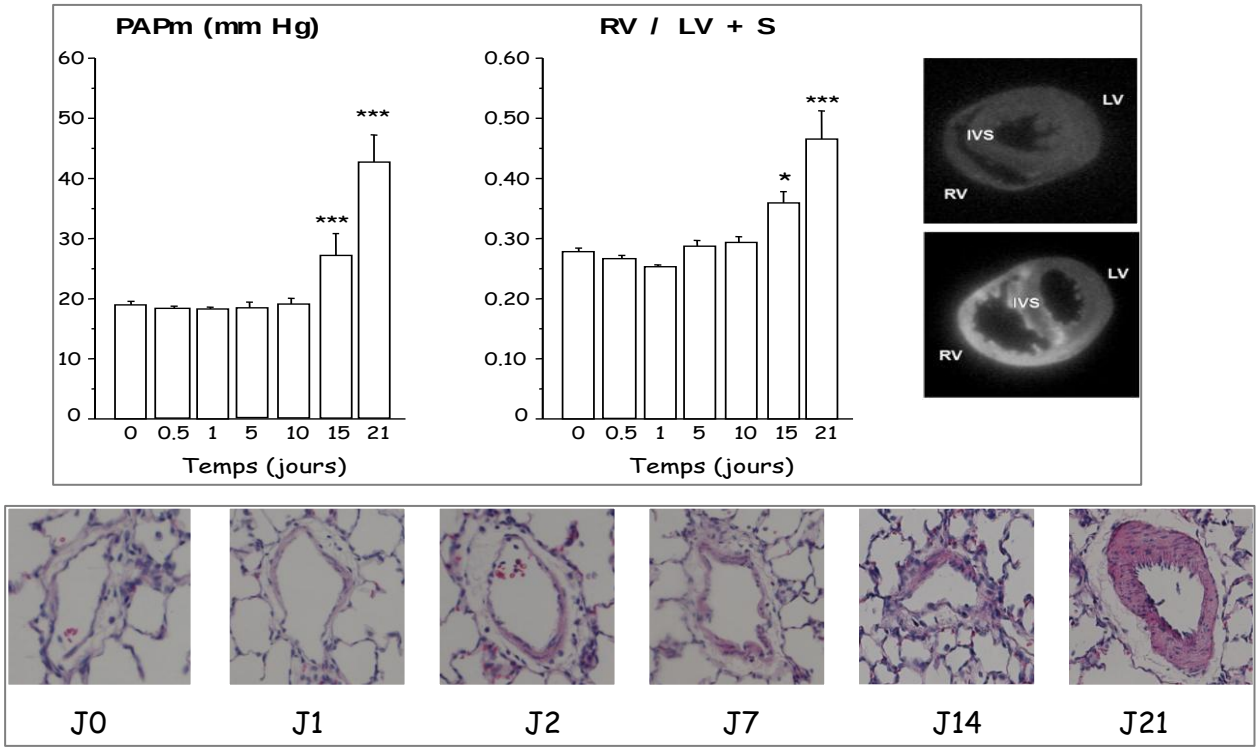


FIGURE 14 : *Evolution de la PAPm, de l'index Fulton, et de la muscularisation. En haut à droite, l'hypertrophie ventriculaire droite*

Plusieurs anomalies biologiques similaires à l'HTAP humaine ont été décrites et comprennent entre autres des altérations de la voie du NO, de l'ET-1, de la 5-HT, du PDGF, du FGF2. De plus, une diminution de l'activité de la voie du BMPR-II a été décrite. Au niveau des média des artérioles pulmonaires sont constatées des diminutions d'expression des canaux potassiques Kv1.5 et une surexpression du 5-HTT. Une forte surexpression de plusieurs cytokines inflammatoires clefs ont été aussi notée : IL-1β, IL-6, MCP-1. Cependant plusieurs différences avec la physiopathologie de l'HTAP humaine sont également constatées.

L'HP induite à la monocrotaline peut être prévenue et/ou améliorée par une large gamme de traitements, incluant les corticoïdes (Hilliker and Roth 1984; Langleben and Reid 1985), les analogues de la prostacycline (Ueno, Naraba et al. 2000; Schermuly, Inholte et al. 2005; Schermuly, Yilmaz et al. 2005), l'inhalation continue de NO (Roberts, Chiche et al. 2000), les inhibiteurs de la PDE-5 (Ghofrani, Voswinckel et al. 2004), les antagonistes non sélectifs (Jasmin, Lucas et al. 2001) ou sélectifs pour le récepteur ET-A à l'ET-1 (Ueno, Miyauchi et al. 2000; Jasmin, Lucas et al. 2001), les inhibiteurs du 5-HTT (Guignabert, Raffestin et al. 2005),

les antagonistes du PDGF (Schermuly, Dony et al. 2005) de l'EGF (Dahal, Cornitescu et al. 2010) et les cellules souches, plus particulièrement celles qui sur expriment la NOS (Zhao, Courtman et al. 2005; Baber, Deng et al. 2007). Cependant, les agonistes du récepteur ET-B aggravent l'HP due à la monocrotaline (Nishida, Eshiro et al. 2004; Nishida, Okada et al. 2004). Enfin, la surexpression d'angiopoiétine-1 protège de l'HP à la monocrotaline (Zhao, Campbell et al. 2003), alors qu'elle participe à l'HTAP (Sullivan, Du et al. 2003; Dewachter, Adnot et al. 2006). Cet effet protecteur de l'angiopoiétine-1 serait attribuable à ses propriétés anti-apoptotiques (Rudge, Thurston et al. 2003).

Ce modèle animal d'HP reste un modèle très utilisé bien que très imparfait de par ses différences avec l'HTAP humaine et de par sa grande variabilité. Les lots de monocrotaline, l'âge/poids des animaux/conditions d'élevage sont d'importants facteurs perturbant fortement la sévérité du modèle. De nombreux autres modèles ont été développé sur la base de ce modèle et inclus :

- -*monocrotaline* + *pneumonectomie :* modèle plus sévère avec une forte inflammation. Des lésions plexiformes ont été décrites dans ce modèle
- -*monocrotaline* + *pneumonectomie chez le jeune rat* : modèle encore plus sévère

4.4.2 Hypertension Pulmonaire Hypoxique chez les Rongeurs (rats/souris)

Ce modèle consiste en l'exposition à l'hypoxie (10% fiO_2) normobarrique ou hypobarrique de manière chronique (3 semaines au minimum). Il s'agit d'un modèle particulier d'HP expérimentale puisqu'il est réversible en quelques semaines (3 à 4 semaines) lors de la remise des animaux dans un environnement normoxique. Ce modèle est plus ou moins sévère en fonction des espèces animales utilisées et nécessite un équipement particulier.

L'exposition à l'hypoxie induit une vasoconstriction pulmonaire initiale qui serait sur le long terme responsable de l'hyperplasie du muscle lisse et du remodelage vasculaire pulmonaire. De fortes différences inter-espèces sont constatées : on retrouve parmi les hypo-répondeurs la chèvre, le lapin, le chien et le cobaye, parmi les répondeurs modérés le rat et parmi les hyper-répondeur le veau et le cochon (Naeije and Dewachter 2007).

Une augmentation significative de la PAPm (Figure 15) est constatée dès la $2^{ème}$ semaine suite à l'exposition à cette hypoxie et qui évolue de manière modérée au fil du temps (30mmHg à la $3^{ème}/4^{ème}$ semaine chez la souris; contre 18-21mmHg chez des souris contrôles). Une hypertrophie ventriculaire droite est retrouvée lors des mesures de l'indice de Fulton. Aucune mortalité n'est constatée et la reproductibilité de ce modèle est très satisfaisante. Cependant, les animaux en croissance sont plus sensibles que les animaux adultes.

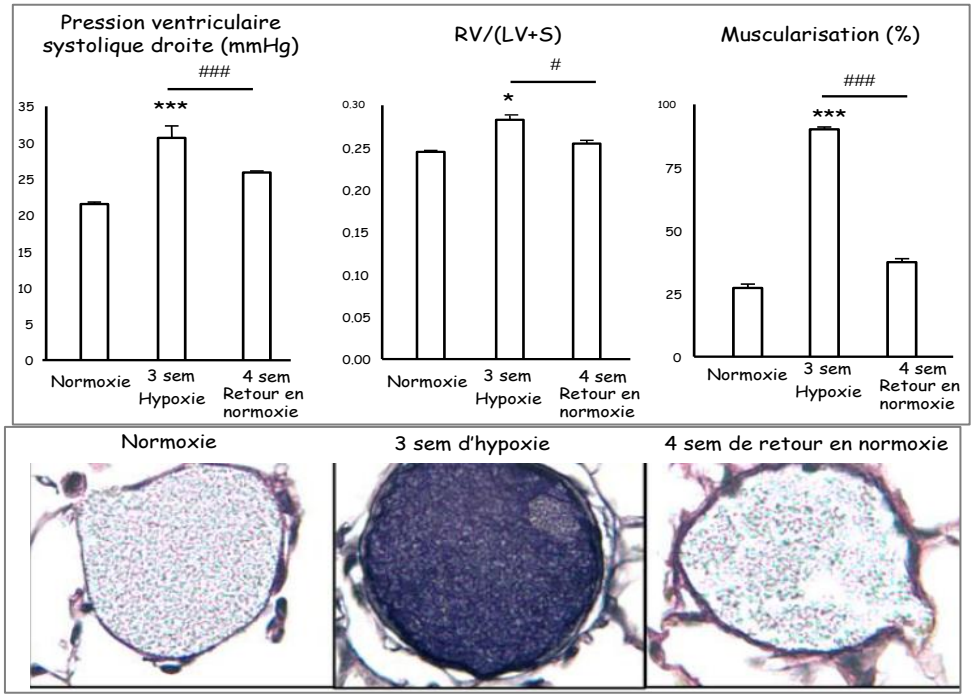


FIGURE 15 : *Pression systolique ventriculaire droite, index Fulton, et pourcentage de vaisseaux musculairisés chez les souris après 3 semaines d'hypoxie et 3 semaines d'hypoxie + 4 semaines de retour en normoxie*

Le remodelage artériel pulmonaire fait rapidement suite à la constriction hypoxique initiale avec très certainement un rôle important joué par l'inflammation. Cependant, ce remodelage constaté est souvent très limité à une hypertrophie médiale et adventitielle. Contrairement au modèle induit à la monocrotaline l'inflammation est très légère et aucune micro-thrombose ou lésion plexiforme n'a été reportée.

Plusieurs anomalies biologiques similaires à l'HTAP humaine ont été notées dans ce modèle. Des altérations de la voie du NO, de la prostacycline, de l'ET-1 et du PDGF ont été décrites. On retrouve également des atteintes de la voie de signalisation du BMPR-II.

L'HP hypoxique peut être prévenue et partiellement reversée par l'administration de NO (Kouyoumdjian, Adnot et al. 1994), d'activateurs du GMP cyclique (Dumitrascu, Weissmann et al. 2006) ou d'inhibiteurs de PDE-5 (Zhao, Mason et al. 2003), d'analogues de la prostacycline (Geraci, Gao et al. 1999; Abe, Tatsumi et al. 2001) d'inhibiteurs du 5-HTT (Marcos, Adnot et al. 2003), d'activateurs de canaux potassiques (Xie, Wang et al. 2004), d'antagonistes sélectifs ou non sélectifs de l'ET-1, d'inhibiteurs de la sérine élastase (Zaidi, You et al. 2002) et d'imatinib, (Schermuly, Dony et al. 2005). L'inhibition des MMP aggrave l'HP hypoxique (Vieillard-Baron, Frisdal et al. 2000).

Ce modèle animal d'HP reste un modèle également très utilisé (essentiellement pour l'utilisation de souris transgéniques) bien que très imparfait de par ses différences avec l'HTAP humaine et

de par sa réversibilité. Tout comme pour le modèle monocrotaline, ce modèle comporte des atteintes multi-organes aux rôles méconnus. D'autres modèles ont été développés sur la base de ce modèle et inclus le modèle *Sugen (inhibiteur du VEGF récepteur) + Hypoxie (SuHx):* modèle très sévère avec une forte inflammation qui ne réverse plus (Taraseviciene-Stewart, Kasahara et al. 2001).

4.4.3 Modèle d'HP induite par le SUGEN 5416 + Hypoxie (SuHx)

Ce modèle consiste en l'administration unique de 20 mg/kg de SU 5416 (un antagoniste du VEGF récepteur) avant une exposition à l'hypoxie (10% fiO_2) de manière chronique (2 à 3 semaines), suivi d'un retour en normoxie (3 à 4 semaines au minimum) (Taraseviciene-Stewart, Kasahara et al. 2001). Il s'agit d'un modèle sévère d'HP expérimentale qui démontre un remodelage intense des artères pulmonaires (Figure 16).

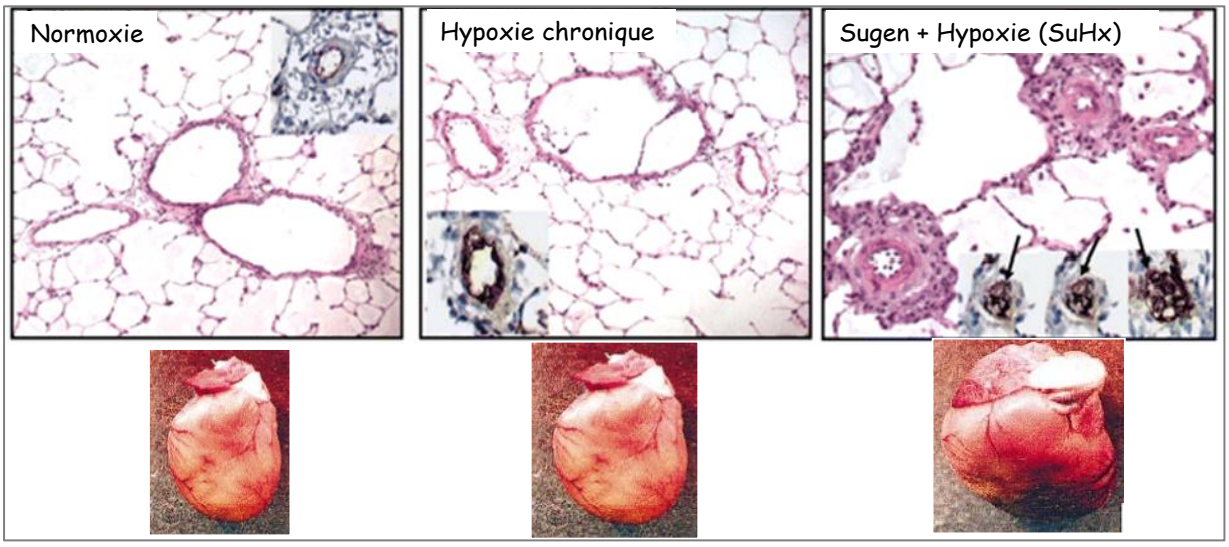


FIGURE 16 : *Comparaison au niveau de la muscularisation des artères pulmonaires et de l'hypertrophie cardiaque de 2 modèles HP Hypoxie et SuHx*

Encore très peu de données sont disponibles concernant ce modèle et sa physiopathologie reste très obscure. Des lésions très sévères avec un remodelage intense touchant aussi bien la media que l'adventice et l'intima sont clairement visible. Une forte hypertrophie cardiaque est aussi constatée. Cependant, le manque de reproductibilité, des atteintes de plusieurs organes et une mortalité quasi absente sont parmi les principaux points faibles de ce modèle expérimental.

4.4.4 Modèles animaux d'Hypertension Pulmonaire sur Shunt

L'HP sur cardiopathie à shunt est le plus souvent réalisé chez le gros animal : porc, agneau et veau, bien que quelques travaux ont été reporté chez le rat (Stenmark, Meyrick et al. 2009;

Ryan, Bloch et al. 2011). Les HP expérimentales sur shunt se limitent à une hypertrophie médiale, avec peu ou pas de modifications intimales ou adventicielles. Ceci paraît lié à des durées d'observation limitées à 2 à 4mois, imposées par la croissance rapide d'animaux de grande taille, tels que le porcelet ou l'agneau, difficile à gérer dans la plupart des animaleries.
Une anastomose aorto-pulmonaire synthétique chez le porcelet reproduit en 3 mois d'évolution une HP sévère, avec hypertrophie médiale. Cette HP expérimentale est clairement liée à l'hyper débit. Comme le diamètre du shunt possiblement réalisable est limité, une anastomose entre l'artère innominée sur le tronc commun des artères pulmonaires ou une ligature d'une des artères pulmonaires peut être également effectuée (modification du shunt de Blalock et Taussig). L'ajout du shunt qui va grandir avec l'animal, expose la circulation pulmonaire à des agressions mécaniques croissantes qui permettent d'obtenir des HP modérées à grave en 3 à 4 mois (30 à 40mmHg). Quelques travaux ont reporté la présence de lésions complexes proche de lésions plexiformes dans ces modèles. Cependant ces modèles dits d'hyper-débit ne sont généralement pas très inflammatoires et sont des hypertensions pulmonaires réversibles.

4.4.5 Animaux Transgéniques et Hypertension Pulmonaire

Plusieurs travaux ont reporté des HP spontanées chez des animaux génétiquement modifiés. Les rats «fawn-hooded rat» qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la 5-HT dans les plaquettes développent lentement une HP. Le développement de l'HP peut être accéléré par une exposition à l'hypoxie/altitude. De même, les rats transgéniques sur-exprimant l'angiopoiétine-1 développent une hypertrophie intimale et une HP (Chu, Sullivan et al. 2004). A l'inverse, le transfert génique d'un antagoniste du récepteur Tie-2 chez le rat prévient l'HP induite par monocrotaline ou par surexpression de l'angiopoiétine-1, mais ne prévient pas l'HP hypoxique (Kido, Du et al. 2005). Des souris sur-exprimant le 5-HTT, le facteur S100A4/mts1, l'IL-6 ou des souris déficientes en PPARγ, VIP, endogline, et ALK1 développent spontanément une HP en conditions normoxiques (MacLean, Deuchar et al. 2004; Merklinger, Wagner et al. 2005; Said, Hamidi et al. 2007; Toporsian, Jerkic et al. 2010; Jerkic, Kabir et al. 2011). Plusieurs autres types de souris transgéniques ont été reportés comme soit plus sensibles soit plus résistantes au développement de l'HP expérimentale induite par exemple à l'Hypoxie chronique : souris déficientes en BMPR-II, en TPH1, en PKC-epsilon, prostacycline, eNOS, smad8, uPA, MCP1 (Stenmark, Meyrick et al. 2009; Ryan, Bloch et al. 2011). De manière surprenante les souris transgéniques pour le BMPR-II ne développent pas d'HP de manière spontanée. Cependant, ces souris déficientes en BMPR-II sont plus susceptibles à développer une HP lorsqu'elles sont soumises à une deuxième « challenge/hit », comme une

administration de 5-HT ou de l'hypoxie chronique (Long, MacLean et al. 2006; Song, Coleman et al. 2008).

Les observations effectuées au travers de ces animaux transgéniques sont informatives puisqu'elles permettent de valider l'importance fonctionnelle d'un facteur ou d'une voie de signalisation dans la physiopathologie de l'HTAP. A quelques exceptions près (souris S100A4/mts1), aucune de ces souches de souris ne peut être considérée comme un modèle d'étude de l'HP mais plutôt comme des outils d'étude de la maladie, car tous les aspects de la maladie ne sont clairement pas présents dans la même souris.

5 Prise en Charge Actuelle des Patients HTAP

Bien que la prise en charge ait considérablement évoluée ces dernières années, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif connu à ce jour. Néanmoins, les thérapies actuelles permettent de ralentir nettement la progression de la maladie et/ou d'améliorer nettement le bien-être des patients. En cas d'échappement thérapeutique ou de dégradation de l'état de santé du patient malgré sa prise en charge, la transplantation cardio-pulmonaire ou bi-pulmonaire est alors la seule alternative. Cependant le taux de survie à 5 ans de 50% est largement insatisfaisant (Fadel, Mercier et al. 2010).

Suite au diagnostic d'HTAP, un traitement anticoagulant est recommandé pour diminuer le risque de thrombose *in situ*. La surcharge hydrosodée, reflet de l'insuffisance cardiaque droite nécessite l'utilisation des diurétiques. Une oxygénothérapie peut également être conseillée pour les personnes dont l'oxygénation du sang est perturbée. En parallèle de ces recommandations générales, plusieurs traitements plus spécifiques de l'HTAP peuvent être proposés comme décrit ci-dessous

5.1 Les Bloqueurs Calciques

L'utilisation des bloqueurs calciques n'est restreint qu'à une faible sous-population des patients HTAP, moins de 10% (Montani, Savale et al. 2010). Ces patients montrent une diminution et parfois une normalisation de la pression artérielle pulmonaire au moment du cathétérisme cardiaque après avoir inhalé du monoxyde d'azote. Malheureusement cette réponse est perdue chez certains patients après plusieurs années et eux sont mis sous les traitements classiques de l'HTAP.

5.2 Prostacyclines et Analogues

Les analogues de la prostacycline, comme l'Epoprosténol qui est l'une des premières molécules approuvées pour le traitement de l'HTAP, sont largement utilisés et permettent une amélioration à la fois de la capacité à l'exercice (mesurée par le 6MWD), une diminution des PAP et des PVR. Une amélioration de la survie des patients HTAP a même été retrouvée : à 1 an (87.8% vs 58.9%), à 2 ans (76.3% vs 46.3%), et à 3 ans (62.8 vs 35.4%) (Rich, Pogoriler et al. 2010). D'autres analogues de la prostacycline comme le Treprostinil, administré par voie sous-cutanée en continu avec des effets comparables à l'Epoprostenol et l'Iloprost, administré par voie inhalatrice plusieurs fois par jour, mais qui est malheureusement moins efficace.

Cependant beaucoup de points limitent parfois l'utilisation de ces analogues de la prostacycline. D'une part, la demi-vie de l'Epoprostenol est très courte de 3 à 5 minutes et demande donc une administration intraveineuse continue. D'autre part, les effets secondaires induits dont des maux de tête, des diarrhées, des douleurs articulaires, des rougeurs et des douleurs aux mâchoires lors de la mastication peuvent contraindre une modification de prise en charge. De grands efforts sont actuellement entrepris pour améliorer les molécules existantes et faciliter leur utilisation.

5.3 Les Inhibiteurs de la Voie de l'ET-1

Le Bosentan et l'Ambrisentan sont deux antagonistes des récepteurs de l'ET-1 a avoir été développés et mis sur le marché. Administrés par voie orale, ces traitements ont démontré des bénéfices cliniques significatifs. Dans une étude sur 169 patients HTAP idiopathique et avec un suivi sur 2 ans, le Bosentan a montré une nette supériorité par rapport au placebo. Mieux supportés que les analogues de la prostacycline, les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 peuvent induire des élévations transitoires des transaminases hépatiques généralement réversibles à l'arrêt du traitement.

5.4 Les Inhibiteurs de la Phosphodiestérase-5

Parmi ces molécules, nous retrouvons le Sildénafil utilisé précédemment pour les dysfonctions érectiles et plus récemment le Tadalafil. L'étude SUPER-1 (Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension) réalisée sur une cohorte de plus de 278 patients avec une HTAP associée ou non à une maladie des tissus conjonctifs ou à une cardiopathie, a révélé une amélioration du 6MWT (*6 min walk test*) et une diminution des PAP suite à la prise de Sildénafil (20, 40, or 80mg, 3 fois par jour) en comparaison des patients ayant reçu le placebo. D'autres études ont

validé ces données sur le long terme (Rubin, Badesch et al. 2011). Les effets secondaires le plus fréquemment observés sont **:** maux de tête, rougeur du visage, troubles de la vision, liés a l'action vasodilatatrice du produit.

5.5 En Cours de Développement et/ou d'Etude en Phase Clinique

5.5.1 Les Activateurs de la Guanylate Cyclase

Récemment, des molécules stimulants la guanylate cyclase, comme le YC-1 et le BAY 420-2272 ont été démontré comme augmentant la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de taux faibles de NO. De plus, une autre molécule de cette classe, le BAY-58-2667, semblerait avoir la capacité d'induire une vasodilatation en absence de NO, grâce à son action sur l'enzyme oxydée ou l'hème libre. Le Riociguat et le Cinaciguat, deux stimulateurs de la guanylate cyclase sont testés dans des phases cliniques avec des résultats plutôt positifs aussi bien sur les paramètres hémodynamiques, l'index cardiaque que sur la capacité à l'exercice.

5.5.2 Les Molécules Anti-Prolifératives

Après la mise en évidence de l'importance de la voie du PDGF dans la physiopathologie de l'HTAP au travers des modèles expérimentaux, l'Imatinib a été testé chez l'humain. Ghofrani *et al.* ont publiés en 2010 les résultats d'une étude de phase II, en utilisant l'Imatinib en plus des traitements spécifiques déjà utilisés dans l'HTAP (Ghofrani, Morrell et al. 2010). Les résultats montrent une amélioration non-significative des paramètres cliniques et hémodynamiques chez les patients traités par l'Imatinib, résultats qui ont permis l'inclusion du médicament dans des études de phase III. Cette classe de médicament semble prometteuse mais encore limitée par le manque de sélectivité et par leurs effets néfastes au niveau cardiaque.

5.5.3 L'Administration de Cellules Progénitrices

Des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) autologues génétiquement modifiées pour sur-exprimer la eNOS ont été administrées à des patients présentant une HTAPi ou associée à une sclérodermie (Campbell, Kuliszewski et al. 1999). Cependant, l'efficacité réelle de cette thérapie reste encore à être démontrée. Plus récemment, une étude menée par l'équipe de Kourembanas et al. (Liang, Mitsialis et al.), montre que l'injection de cellules souches stromales mésenchymateuses améliore l'HTAP induite par l'hypoxie chronique chez les souris en terme de l'hémodynamique et réduction de l'hypertrophie cardiaque droite. Cet effet est d'autant plus important si ces cellules souches stromales mésenchymateuses portent un transgène sur-

exprimant le gène *Hème oxygénase-1*. *In vitro*, ces cellules sont capables de réduire l'inflammation et la prolifération de CML.

REVUE SUR LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE ASSOCIEE A L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

Il existe deux grands types d'artères : les artères pulmonaires et les artères systémiques.

- **Les artères pulmonaires** sont issues du tronc pulmonaire, lui même en continuité du ventricule droit du cœur. Elles charrient un sang pauvre en dioxygène, qui va rejoindre la microcirculation pulmonaire pour s'oxygéner lors de leur passage autour des alvéoles pulmonaires.
- **Les artères systémiques** sont celles qui apportent un sang riche en dioxygène (et en nutriments) vers les cellules pour leur permettre d'assurer leur survie.

La paroi artérielle est constituée de trois couches individualisées, de la lumière à la périphérie (Figure 17) : l'intima, la média et l'adventice (Mulvany and Aalkjaer 1990) :

- **L'intima :** c'est la couche la plus interne, elle est constituée d'une monocouche de CE et d'une membrane basale (collagène de type IV, laminine, glycoprotéines). L'intima joue un rôle majeur d'interface entre le sang et la paroi artérielle. Les CE ont une fonction fibrinolytique, anti thrombotique, elles permettent la modulation de la vasomotricité artérielle par la synthèse et la transmission de nombreuses substances vasoactives vers le muscle lisse sous-jacent. À la différence des veines qui sont flasques, les artères ne disposent pas de valves.

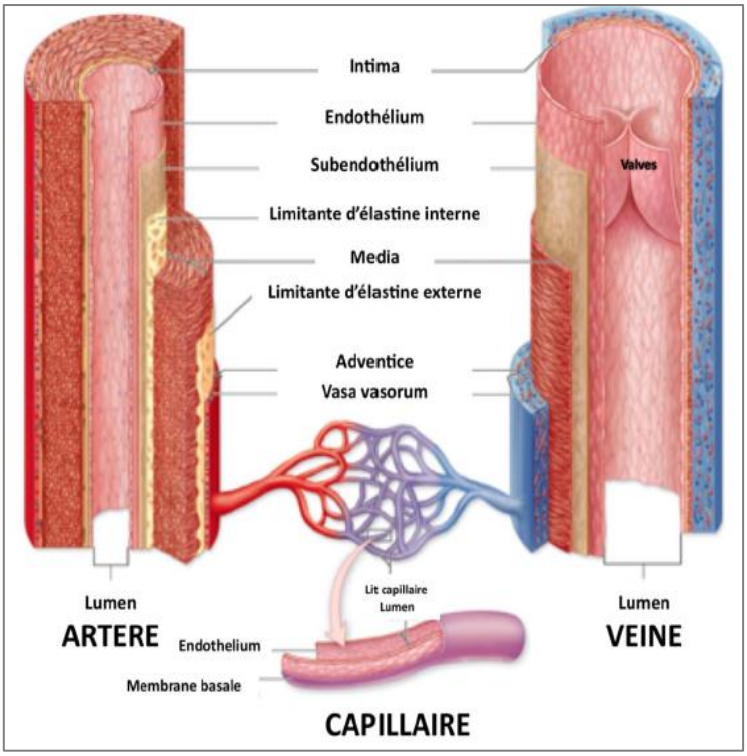


FIGURE 17 : Structure d'artère et de veine

- **La média :** c'est la couche centrale, la plus épaisse de la paroi artérielle. Dans les artères de gros calibre, elle est limitée par une lame élastique interne côté luminal (limitante d'élastine interne) et une lame élastique externe (limitante d'élastine externe) et se compose d'une succession de sous-couches délimitées par les lames élastiques. Dans les artérioles, la lame élastique externe est fragmentée ou bien absente. La média est constituée essentiellement de CML. Ces cellules sont indispensables pour la relaxation et la contraction des artères.

- **L'adventice :** C'est la couche périphérique. Elle est essentiellement constituée de tissu conjonctif (élastine, collagènes), de fibroblastes, macrophages, terminaisons nerveuses et de vasa vasorum.

C'est sur cette structure en trois couches que reposent de nombreuses fonctions physiologiques, dont la principale est d'assurer l'échange gazeux. Il existe également de nombreuses interactions entre les différentes couches, plus particulièrement entre les CML et les CE, mais également avec les éléments du plasma et figurés du sang (plaquettes, globules rouges et blancs).

L'endothélium vasculaire n'est plus considéré comme une simple barrière inerte entre le sang et les tissus (Bunting, Gryglewski et al. 1976; Furchgott and Zawadzki 1980). Bien au contraire, les diverses fonctions de l'endothélium comprennent le contrôle du tonus vasculaire, la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des CML et la régulation de la fibrinolyse. Les facteurs impliqués dans ces nombreux processus physiologiques sont sécrétés lorsque l'endothélium est activé par des agonistes tels que les neurotransmetteurs, les hormones circulantes, les produits des plaquettes ou de la coagulation sanguine. Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux. Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés du thromboxane A2, des anions superoxydes, de l'ET-1, de la prostaglandine H2 et d'Ang-II. Les trois principaux facteurs vaso-relaxants sont le NO, la prostacycline, et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium EDHF. Ainsi, l'endothélium joue un rôle crucial en maintenant un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, en régulant la prolifération des CML et en maintenant un équilibre entre des activités anti-/pro-fibrinolytique et anti-/pro-thrombotique. Ce rôle est d'autant plus important que c'est l'endothélium qui permet l'adaptation temporaire des différentes régions vasculaires en réponse à divers stimuli ou pour faire face à un afflux de sang. La perte de cette propriété physiologique cruciale des vaisseaux, appelée dysfonction endothéliale, survient dans toute une série de pathologies du registre de la Médecine Interne : artériosclérose, hypercholestérolémie, diabète de type II, syndrome métabolique, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, tabagisme, excès de drogues «récréationnelles» et HP. Ces dernières années, les travaux ont la dysfonction endothéliale au cœur du développement d'HTAP (Figure 18). Ce chapitre décrit les différentes voies de la dysfonction endothéliale et ses conséquences.

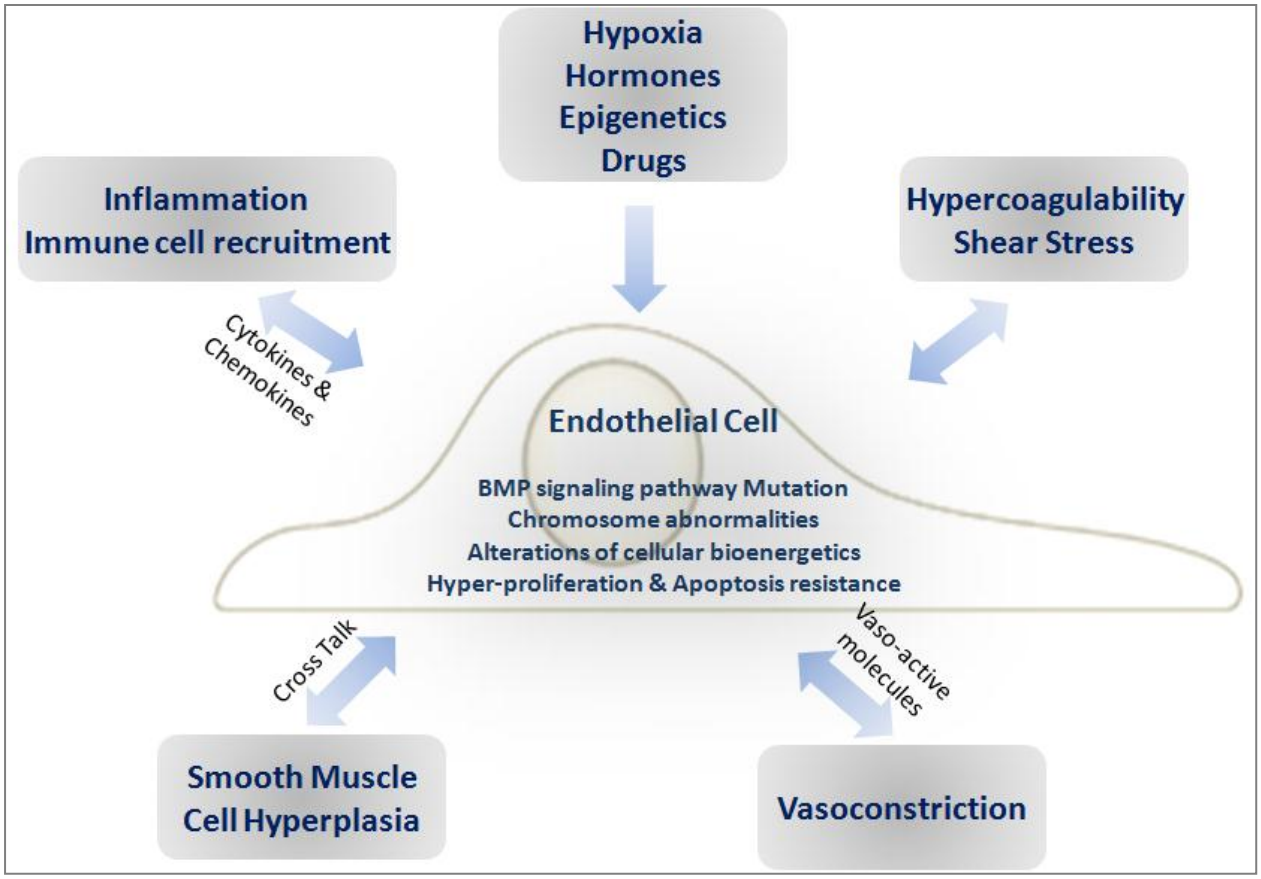


FIGURE 18 : *Schéma illustrant les anomalies de la CE pulmonaire dans la pathogenèse de l'HTAP avec ses interactions avec l'environnement et les autres cellules.*

1 Le Déséquilibre entre Vasodilatateurs/Vasoconstricteurs

Comme évoqué précédemment, plusieurs travaux menés sur des CE de patients HTAP ont révélé de nombreux signes de dysfonction endothéliale, comprenant entre autres : une surexpression de plusieurs molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) ; des synthèses perturbées de molécules vaso-réactives (NO, prostacycline, ET-1, 5-HT, thromboxane) (Figure 19) ; une participation active au remodelage de la MEC (protéases et inhibiteurs de protéase, synthèse de composé de MEC) ; défauts de balance entre prolifération/apoptose ; communication intercellulaire perturbée avec les CML et cellules immunitaires ; synthèse de diverses molécules jouant sur l'inflammation et l'auto-immunité ; synthèse de facteurs pro-coagulants. De plus, il s'avère que les CE HTAP possèdent plusieurs anomalies intrinsèques qui peuvent expliquer ce phénotype anormal dans la maladie.

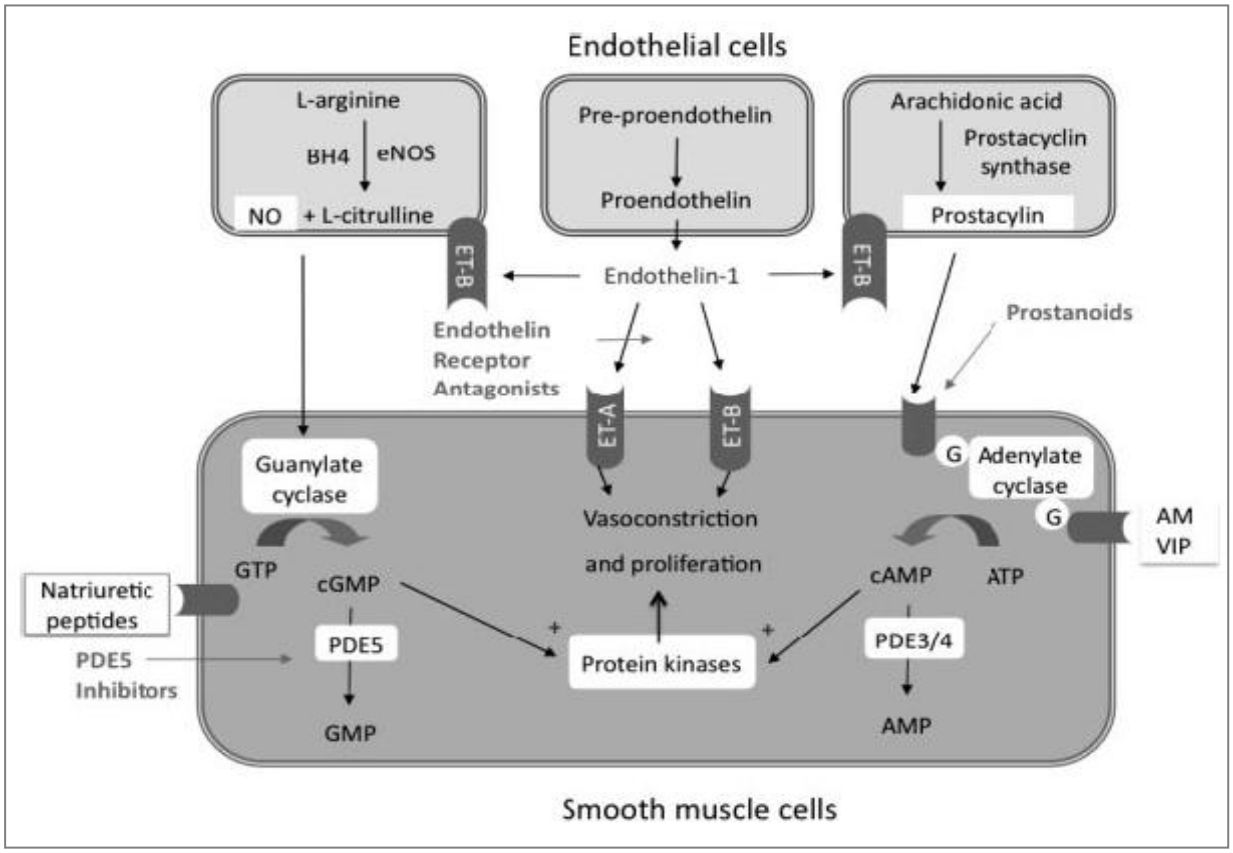


***FIGURE 19** : Les trois grands facteurs vaso-actifs de la CE (NO, ET-1 et PGI2) et ses effets sur les CML*

L'endothélium libère des facteurs de croissance divers et des médiateurs vaso-actifs, qui régulent les propriétés physiques et biochimiques des vaisseaux pulmonaires et affectent la contractilité vasculaire et la croissance cellulaire (Figure 19). Chez les individus sains, un équilibre entre ces médiateurs existe et permet le faible tonus basal des vaisseaux pulmonaires, l'homéostasie et la réparation des lésions vasculaires. Une altération de cet équilibre essentiel altère les propriétés des vaisseaux pulmonaires dans l'HTAP.

1.1 Diminution des Facteurs Vaso-dilatateurs

1.1.1 Le Monoxyde d'Azote (NO)

Le rôle de NO dérivé de l'endothélium dans la pathogenèse de l'HTAP reste mal compris. Les données disponibles suggèrent que le NO est au moins partiellement responsable de la vasorelaxation pulmonaire. L'enzyme NO synthase de type endothéliale (eNOS) catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline, et produit ainsi le NO. Le NO active la guanylate cyclase et augmente le taux de GMP cyclique dans les CML, entraînant une vasodilatation. En dehors d'une expression de base constitutive, l'eNOS peut être modulée par divers stimuli tels

que les forces hémodynamiques (ou *shear stress*) et une augmentation du débit sanguin pulmonaire. Le rôle spécifique d'eNOS dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire a été bien étudié dans les modèles animaux d'HP. La sur-expression d'eNOS dans des souris transgéniques protège contre l'HTAP induite par l'hypoxie (Champion, Bivalacqua et al. 1999). A l'inverse, les souris déficientes en eNOS présentent une HTAP sévère suite l'exposition à l'hypoxie modérée (Quinlan, Li et al. 2000). Cependant, les études sur les biopsies humaines ont montré une expression variable d'eNOS dans les patients d'HTAPi avec une expression réduite dans les vaisseaux pulmonaires mais parfois une expression accrue dans l'endothélium des lésions plexiformes (Mason, Springall et al. 1998). Le NO protège la vasoconstriction induite par l'hypoxie dans les poumons, inhibe la prolifération du muscle lisse et l'agrégation plaquettaire, et régule la baisse de production d'ET-1. Le rôle hypothétique de la déficience du NO dérivé de l'endothélium dans la pathogénèse de l'HTAP est renforcé par les effets bénéfiques du NO inhalé et des donneurs de NO tels que la L-arginine chez les patients traités.

1.1.2 La Prostacycline

La prostacycline a un puissant effet vasodilatateur pulmonaire et des propriétés d'agrégation plaquettaire (Stitham, Midgett et al. 2011). Il est synthétisé à partir de la cyclo-oxygénase par la voie arachidonique dans l'endothélium vasculaire. Bien que la prostacycline ne puisse pas contribuer à la vasorelaxation basale pulmonaire, il protège contre la vasoconstriction pulmonaire et le remodelage en réponse à divers stimuli. La surexpression de la prostacycline protège les souris à l'HTAP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Geraci, Gao et al. 1999). En revanche, les souris déficientes en récepteur de la prostacycline développent une HTAP sévère induite par l'hypoxie (Hoshikawa, Voelkel et al. 2001). Dans le modèle monocrotaline, le traitement par une dose de microsphères contenant des polymères des analogues de prostacycline attenue le développement de l'HTAP induite. Une diminution de l'expression de la prostacycline synthase a été observée dans les artères pulmonaires des patients HTAPi sévère, porto-pulmonaire ou associée au VIH, et les niveaux urinaires des métabolites de la prostacycline sont également diminués chez les patients. La baisse de la prostacycline peut expliquer en outre la vasoconstriction pulmonaire, la prolifération des CML, et la dérégulation de la coagulation (Obata, Sakai et al. 2008).

Le rôle de la prostacycline dans l'HTAP est démontré par le succès du médicament dans le traitement de cette maladie. Plusieurs essais ont montré de façon constante une amélioration de la capacité d'exercice, l'hémodynamique cardio-pulmonaire, la classe fonctionnelle NYHA

(*New York Heart Association*), les symptômes, ainsi que la survie des patients HTAP traités avec une perfusion continue de prostacycline intraveineuse (époprosténol).

1.2 Augmentation des Vaso-constricteurs

1.2.1 L'Endotheline-1 (ET-1)

L'ET-1, un peptide de 21 acide-aminés avec une activité vasoconstrictrice puissante et des propriétés d'agrégation de plaquettes, est largement distribué dans l'endothélium humain. La production d'ET-1 est élevée dans des modèles animaux d'HP et chez les patients. En outre, il y a une forte corrélation entre la production d'ET-1 et la résistance vasculaire pulmonaire chez les patients HTAP et des HP liées à un syndrome d'Eisenmenger (Cacoub, Dorent et al. 1997). Le ratio du taux d'ET-1 dans les artères et les veines pulmonaires est significativement augmenté chez les patients, ce qui suggère une surproduction ou une diminution de la clairance de cette molécule. Chez les mammifères, l'ET-1 agit de façon paracrine sur 2 types de récepteurs à l'ET-1 : ETA et ETB. L'ETA et l'ETB sont présents sur les CML vasculaires pulmonaires et agissent sur leur vasoconstriction et leur prolifération, ETB est aussi présent au niveau des CE où il stimule la vasodilatation par l'intermédiaire du NO et de la PGI2. L'expression de l'ARNm des deux récepteurs est augmentée dans des modèles animaux d'HP (Li, Chen et al. 1994; Frasch, Marshall et al. 1999). Chez l'homme, une importante augmentation de l'expression du gène du récepteur ETB a été rapportée dans l'HTAP thromboembolique sévère (Bauer, Wilkens et al. 2002). L'antagoniste des récepteurs, tels que le Bosentan, améliore l'état fonctionnel des patients (Rubin, Badesch et al. 2002).

1.2.2 La Sérotonine (5-HT)

Cette partie est traitée au chapitre précédent (page 24).

1.2.3 La Tromboxane

La Thromboxane est produite par des cellules endothéliales et les plaquettes. Il est un puissant vasoconstricteur, un mitogène du muscle lisse, et un inducteur de l'agrégation plaquettaire. Une augmentation de la production de métabolites thromboxane A2 est retrouvée dans l'HTAP (Christman, McPherson et al. 1992). L'inhibition de thromboxane produit une légère amélioration de l'hémodynamique pulmonaire dans une petite étude de patients HTAP (Rich, Hart et al. 1987). Cependant, un vaste essai clinique impliquant un inhibiteur de la

thromboxane, terbogrel, a dû être interrompu prématurément en raison de douleurs aux jambes graves dans le groupe traité (Langleben, Christman et al. 2002). Néanmoins, une inhibition significative de thromboxane dans cette étude suggère un rôle potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de la thromboxane avec un meilleur profil de sécurité.

2 Communications Intercellulaires Aberrantes de la CE-HTAP

En contact direct avec le sang, l'endothélium est placé comme un élément privilégié de communication. Il est capable d'interagir également avec les cellules voisines plus particulièrement les CML. Cette communication intercellulaire lui permet d'assurer ses principales fonctions qui sont : le contrôle du tonus musculaire. (via ses facteurs vaso-actifs, l'inflammation via des médiateurs chimio-attractants), le contrôle de la coagulation, et de l'angiogenèse.

2.1 Communications Aberrantes entre CE et CML dans l'HTAP

Le rôle des CE dans l'angiogenèse et le remodelage est maintenant mieux compris. Un aspect essentiel du développement des vaisseaux est la maturation, au cours de laquelle les CE ne prolifèrent plus ou ne migrent plus, mais stabilisent le vaisseau en recrutant des cellules de soutien péri-endothéliales (Folkman and D'Amore 1996; Hanahan 1997). Les interactions entre les CE et les cellules murales (péricytes et CML vasculaires) dans la paroi des vaisseaux sanguins ont récemment émergé comme un processus central dans la régulation de la formation vasculaire, sa stabilisation, son remodelage et sa fonction. Le défaut des interactions entre les deux types de cellules, comme dans de nombreux modèles génétiques de souris, résulte en des anomalies cardiovasculaires sévères au stade embryonnaire et sont souvent létales à la naissance. Les interactions anormales entre ces deux types de cellules sont également impliquées dans un certain nombre de maladies humaines, y compris l'angiogenèse tumoral, et des maladies vasculaires (Jain and Booth 2003; Armulik, Abramsson et al. 2005). Ainsi, les CE constitutivement produisent et libèrent des facteurs de croissance qui agissent sur CML-AP et dont la fonction physiologique est de recruter ces cellules pour maintenir une couche de muscle lisse autour des vaisseaux pulmonaires. L'activation anormale de ce processus peut conduire à un remodelage vasculaire pathologique. Inversement, les carences dans ce processus peuvent conduire à une dilatation anormale des vaisseaux comme on en observe dans la pathologie de l'hémorragie héréditaire télangiectasie (Folkman and D'Amore 1996; Hanahan 1997). Des études récentes fournissent des preuves que la dérégulation des

voies moléculaires qui régissent la maturation des vaisseaux a été impliquée dans le processus de remodelage vasculaire pulmonaire au cours de l'HP.

L'exposition de CML-AP au milieu de culture de CE induit la prolifération des CML et cet effet est beaucoup plus fort lorsque les CE proviennent de patients HTAPi (Eddahibi, Guignabert et al. 2006). De façon intéressante, ces résultats ont été obtenus en utilisant des cellules en culture non stimulées. L'effet stimulant du milieu de CE sur la croissance des CML est supérieur de patients HTAPi que des contrôles, ce qui indique qu'il y a des altérations dans la communication entre les deux types cellulaires et ceci pourrait être une étape critique dans le remodelage vasculaire pulmonaire.

Cette communication aberrante est liée à plusieurs altérations au niveau de la CE avec une synthèse exagérée de facteurs proliférant (figure 20). L'étude menée par Giaid A *et al*. (Giaid 1998) a montré que l'expression de l'enzyme ECE-1 (*Endothelin converting enzyme 1*) est augmentée au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires lésées. Ce qui explique une synthèse plus importante de l'ET-1 qui va pouvoir induire la contraction et la prolifération de CML via son récepteur ET-A. Cependant l'altération de cette voie est incomplète pour expliquer l'hyperplasie des CML dans l'HTAP. En effet, une étude menée par notre équipe montre pour la première fois que les CE présentent une expression et une activité de TPH1 (*Tryptophan hydroxylase 1*) et donc les CE sont capable de synthétiser la 5-HT au niveau des vaisseaux pulmonaires alors qu'il était considéré que la seule source de 5-HT provenait des plaquettes ou des cellules enterochromaffines périphériques (Eddahibi, Guignabert et al. 2006). Cette synthèse est inhibée par le PCPA (*p*-chlorophenylalanine), inhibiteur de TPH1. Dans cette même étude, il a été montré que les CE-HTAP ont une expression significativement plus importante en cette enzyme TPH1 et donc produisent plus de la 5-HT. Cet excès de 5-HT agit ensuite sur les CML adjacentes en induisant une prolifération locale. La réponse est d'autant plus exagérée avec les CML HTAPi du fait que ces cellules possèdent des récepteurs sérotonergiques et une forte activité du transporteur pour la 5-HT.

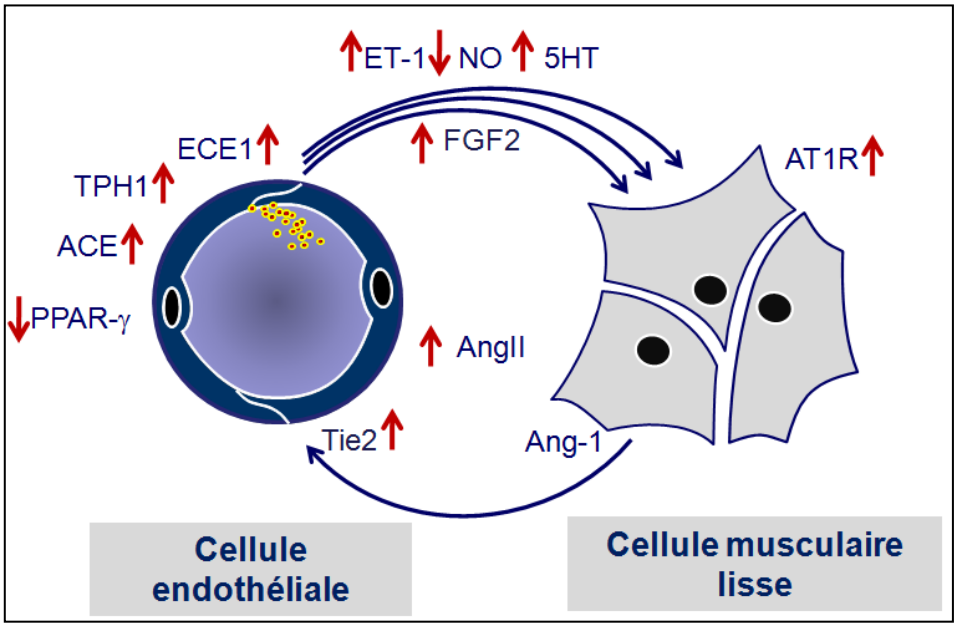


FIGURE 20 : *Communication intercellulaire CE/CML via des médiateurs et les récepteurs*

Plus récemment, toujours au sein de notre équipe, il a été démontré que le FGF2 est impliqué dans la pathogénèse de l'HTAPi (Izikki, Guignabert et al. 2009; Tu, Dewachter et al. 2011). *In situ*, au niveau des lésions vasculaires pulmonaires des patients HTAP, l'ARNm codant pour le FGF2 a été retrouvé très abondant au niveau de l'endothélium. De même, *in vitro*, nous avons montré que l'expression élevée en FGF2, ainsi que son relargage est conservée par les CE isolées de patients HTAPi. Le FGF2, un facteur de croissance soluble à forte activité mitogénique, ainsi libérée, agit sur la prolifération des CML-AP. Cette prolifération est amplifiée avec le milieu de CE issu de patients HTAPi. En revanche, le milieu de CE après une répression de l'expression du FGF2 avec un siRNA dirigé contre la protéine, réduit significativement l'effet stimulant sur des CML-AP au même niveau que celui des CE témoins. Dans cette même étude, l'expression du FGF2 est également dérégulée dans le modèle expérimental avec une augmentation au niveau pulmonaire de rats traités à la monocrotaline.

D'autres voies sont également dérégulées dans cette communication intercellulaire. Les souris transgéniques déficientes pour le facteur de transcription *PPARγ* au niveau de l'endothélium développent spontanément une HP (Guignabert, Alvira et al. 2009). Deux mécanismes sont venus étayés le phénotype HTAP. D'une part, au niveau pulmonaire, une déficience endothéliale en *PPARγ* provoque une altération de l'expression pour la protéine apoE. Cet apolipoprotéine diminuée est la cause d'une suractivité du récepteur PDGFR-β au niveau du muscle lisse et donc de l'hyperplasie de la média. Ce résultat a pu être confirmé par un traitement avec l'imatinib qui a permis de retrouver un phénotype normal chez cette souris transgénique. D'autre part, il a été démontré que la protéine apeline est diminuée dans ce

modèle et plus particulièrement au niveau de l'endothélium (Alastalo, Li et al. 2011). Ceci contribue à la prolifération exagérée des CML-AP. Encore une fois, cette étude met en évidence qu'une simple perturbation au niveau de l'endothélium est capable d'engendrer un remodelage vasculaire pulmonaire en influençant le comportement des CML par une induction de prolifération et par une inhibition de la voie anti-prolifération.

Tout récemment, une nouvelle voie a été décrite dans cette communication intercellulaire exagérée : le système RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosterone System). Cette voie est altérée en faveur d'un développement pour l'HTAP pour plusieurs raisons. D'abord tous ces facteurs pro-vasoconstricteurs, l'Ang-I et l'Ang-II sont augmentés au niveau sérique des patients HTAPi (Frances De Man *et al*. AJRCCM, 2012, en révision voir Page 147). L'activité de la rénine est également significativement augmentée au-delà de la moyenne observée chez les patients sains. Et de manière plus intéressante, nous avons montré les CE-HTAPi, *in vitro*, ont une activité anormalement élevée pour convertir l'Ang-II à partir de l'Ang-I. De même, l'Ang-II induit une prolifération de CML AP qui exprime de manière anormalement élevée les récepteurs AT1R. Dans le modèle expérimental de rats traités à la monocrotaline, un traitement avec l'inhibiteur de l'AT1R, le losartan, réduit considérablement le phénotype HTAP des rats.

L'ensemble de ces résultats souligne que la communication intercellulaire entre CE-CML existe dans le cadre de l'HP. Elle est dérégulée de manière à favoriser localement une hyper-prolifération des CML via différents mécanismes moléculaires. Cette communication anormale est liée à la dysfonction endothéliale et au phénotype anormal de la CE HTAP qui sécrète de manière exagérée des facteurs solubles. Cependant et de manière intéressante, l'étude menée par Laurence Dewachter *et al.*, (Dewachter, Adnot et al. 2006) montre que ce phénotype de sécrétion anormale peut être amplifié sous l'influence des CML. En effet, dans cette étude, la CE HTAP présente une expression forte du récepteur Tie2 (ou *TEK*). L'activation de ce récepteur en présence de son ligand, l'Angiopoietine-1, engendre une production plus importante en 5-HT et en ET-1. En effet, cette voie Ang1/ Tie2 stimule l'expression de TPH1, d'ECE-1 et de préproET-1.

La communication intercellulaire entre CE-CML est altérée en faveur d'un remodelage vasculaire pulmonaire avec une prolifération exagérée des CML. Ces études montrent pour la plupart que la dysfonction endothéliale est à l'origine de cette communication anormale, mais qu'elle peut être amplifiée par les facteurs environnants. De plus de son contact direct avec le sang, l'endothélium communique avec les facteurs solubles sanguins et les cellules circulantes.

2.2 Communication Aberrante entre CE et Cellules Inflammatoires

Cytokine/Chemokine	Cellular Source	Cellular Target	Biologic Function
IL-1-β[33,34]	Macrophages, lymphocytes, EC, PASMC	Many cell types	Proinflammatory, stimulates endothelial and PASMC activation
IL-4[34,86]	Th2 cells, mast cells	T cells, B cells, mast cells, macrophages, hematopoietic progenitors	Proliferation and differentiation of B cells and Th2 cells
IL-6[33,34]	Macrophages, EC, PASMC, T cells	T cells, B cells, EC, PASMC	Differentiation of myeloid cells, induction of acute phase proteins, PASMC proliferation
IL-8[34]	Monocytes, EC, T cells	Neutrophils, T cells, monocytes	Proinflammatory, promotes leukocyte arrest
IL-10[34]	Macrophages, Th2 cells, Treg cells, B cells, mast cells	Macrophages, T cells, B cells	Antiinflammatory, inhibits Th1 response, promotes proliferation and differentiation of Treg cells; promotes differentiation and maturation of B cells, plasma cells (and antibody production)
IL-12[34]	Th1 cells	T cells, macrophages	Proinflammatory, promotes NK cell and cytotoxic lymphocyte activity, induces IFN-γ
IL-13[86,106]	Many cells, especially Th2 cells	Similar to IL-4	Important in allergic and parasitic disorders
TNF-α[34]	Macrophages, T cells, B cells, NK cells, PASMC	Many cell types	Proinflammatory, fever, neutrophil activation, bone resorption, anticoagulant, tumor necrosis
TGF-β[34]	Platelet, macrophages, Th2 cells, Treg cells, B cells, PASMC	Many cell types	Antiinflammatory, profibrotic, promotes wound healing, angiogenesis, suppresses Th1 and Th2 responses
CCL2/MCP-1[35]	Many cells including EC, PASMC	Monocytes, memory T cells, DC, basophils	Monocyte migration into tissue to become tissue macrophages (especially with PAH EC), may increase ET-1 and ECE-1[107]
CCL5/RANTES[36]	T cells, EC	T cells, monocytes, eosinophils, basophils (any cell expressing CCR5 receptor)	Chemoattractant for monocytes and T cells, may also induce ET-1 and ECE-1[107]
CXCL10[108]	Monocytes, EC, and fibroblasts in response to IFN-γ	Binds to cell surface receptor CXCR3 on monocytes/macrophages, T cells, NK cells, DC	Chemoattractant for monocytes/macrophages, T cells, NK cells, DC; promotes T-cell adhesion to EC; inhibits angiogenesis
Fractalkine/CX3CL1[37,82]	Macrophages, T cells, PASMC, EC	Soluble form $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, monocytes, cell-bound form targets activated EC	Soluble form chemoattracts T cells and monocytes; cell-bound form interacts with CX3CR1, promotes leukocyte adhesion to activated EC; growth factor for PASMC

***TABLEAU 1** : les médiateurs inflammatoires impliqués dans la physiopathologie l'HTAP*

Le rôle de l'inflammation dans le développement de la HTAP a été plusieurs fois décrit et les CE jouent clairement un rôle important dans les processus inflammatoires (Tuder, Groves et al. 1994; Humbert, Monti et al. 1995; Fartoukh, Emilie et al. 1998; Voelkel, Cool et al. 1998). Les cellules inflammatoires, y compris les macrophages et les lymphocytes, sont augmentées dans les lésions de types plexiformes dans l'HTAP. Les niveaux de protéines inflammatoires l'IL-1β, et l'IL-6 ont été également trouvé augmentés dans le sérum des patients HTAP. Bien que des sources de ces cytokines ou chemokines proviennent en majeure partie des cellules inflammatoires comme les monocytes/macrophages ou les lymphocytes B et T (Tableau 1), il est à noter que les CE sont capables de produire ces médiateurs notamment de l'IL-1β, l'IL-6,

l'IL-8, le MCP-1, le CCL5, CXCL10 et le Fracktalkine et participent donc activement à l'inflammation.
Sanchez *et al.* (Sanchez, Marcos et al. 2007) ont montré que les CE-HTAP par rapport aux CE-témoins sécrètent plus de MCP-1 et recrutent de façon anormale les monocytes.

D'autre part, les CE ont à leur surface des protéines membranaires, comme la P-sélectine dont les ligands se trouvent au niveau des leucocytes et des plaquettes. Cette protéine P-sélectine est retrouvée augmentée chez les patients HTAPi. Ces données montrent que les CE-HTAP peuvent favoriser le recrutement des cellules inflammatoires au niveau de la lésion vasculaire expliquant la présence des infiltrations des cellules inflammatoires autour du vaisseau (Sakamaki, Kyotani et al. 2000). Une étude menée par Wright *et al.* démontre une augmentation de l'expression de la 5-lipoxygénase (5-LO) et de la protéine FLAP (*5-lipoxygenase activating protein*), au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires des patients HTAP. Ces 2 médiateurs sont impliqués dans la synthèse des leucotriènes qui vont activer et recruter les cellules sur le site de l'inflammation. De plus, la délétion de l'enzyme 5-LO ou l'inhibition de FLAP (5-*lipoxygenase activating protein*) chez la souris est protecteur contre le développement de l'HTAP induite par hypoxie chronique (Voelkel, Tuder et al. 1996; Wright, Tuder et al. 1998). Le lien entre les CE et les cellules inflammatoires est très étroit du fait de leurs localisations privilégiées dans la paroi vasculaire. Cette communication se fait via des médiateurs solubles et des récepteurs présents à leurs surfaces membranaires. Les CE sécrètent des cytokines et des chemokines de façon à recruter des cellules inflammatoires, mais les CE-HTAP aussi présentent un phénotype anormal avec un recrutement excessif de cellules inflammatoires au niveau des lésions vasculaires. Récemment, un rôle des CE dans la modulation de la fonction des cellules T régulatrices, au travers de leur synthèse de leptine, a pu être mis en évidence (Huertas, Tu et al. 2012).

3 Anomalies de l'Hypercoagulabilité

La coagulation sanguine est un processus complexe aboutissant à la formation de caillots sanguins. Lorsque la paroi d'un vaisseau sanguin est endommagée, un caillot composé d'un réseau de fibrine est formé pour arrêter l'hémorragie (Figure 21). Un ensemble de facteurs complexes issus du système des éléments du sang ou du tissu régule la formation de ce réseau de fibrine. Parallèlement, un ensemble de facteurs du système fibrinolytique active la fibrinolyse. Cet ensemble fait intervenir les plaquettes, les protéines circulantes mais aussi l'endothélium.

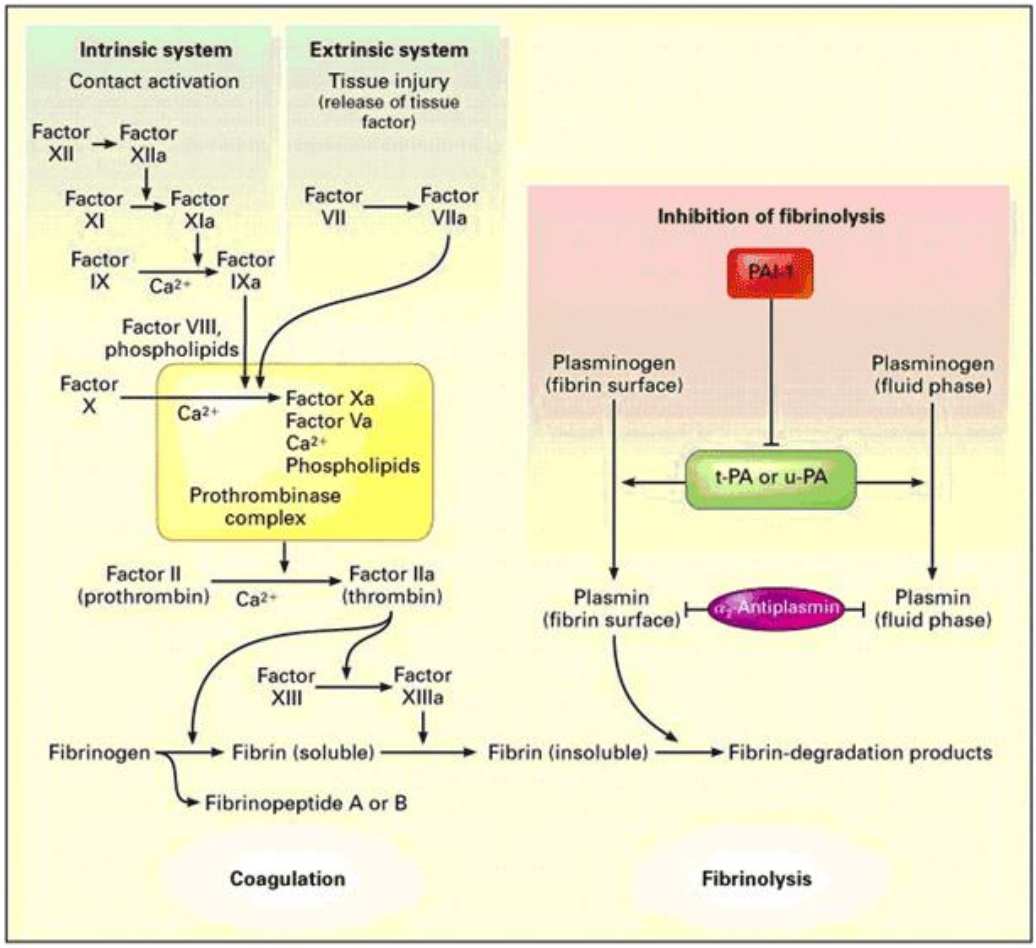


FIGURE 21 : *Mécanisme moléculaire de la coagulation et de la fibrinolyse (James L. Holly, 2007)*

La thrombose est ainsi un processus complexe caractérisé par une interaction des CE avec les deux éléments solubles (protéines plasmatiques de la coagulation) et des éléments cellulaires du sang (plaquettes). Dans un état normal, un équilibre existe entre thrombose en cours et prévention de la formation d'un caillot à la fois par des systèmes anti-thrombotiques et fibrinolytiques. Des anomalies de thrombose intravasculaire pulmonaire ont pu être clairement mises en évidence dans l'HP. En effet, dans l'étude menée par Eisenberg *et al*, le niveau du fibrinopeptide (un marqueur de la dégradation de la fibrine) est élevé significativement dans tous les patients atteints d'HP et plus nettement dans 19 cas parmi les 31 patients étudiés (Eisenberg, Lucore et al. 1990). L'endothélium joue un rôle clé dans le maintien de la coagulation normale grâce à l'élaboration de diverses substances telles que les facteurs humoraux, l'héparane sulfaté, la thrombomoduline, *tissue-type plasminogen activator* (t-PA), *urokinase-type plasminogen activator* (u-PA), et le facteur *von Willebrand* (vWF). Les CE non seulement facilitent le processus thrombotique, mais aussi inhibent activement la thrombose et est capable de promouvoir la fibrinolyse. La production et la libération de NO et la prostacycline, deux inhibiteurs puissants de l'agrégation plaquettaire, par les CE sont des mécanismes

importants dans la prévention de la thrombose intra-vasculaire (Vane, Anggard et al. 1990; Moncada, Palmer et al. 1991).

Deux études de cohortes rétrospectives basées sur des évaluations histologiques de tissus HTAPi ont évalué le taux de prévalence de l'artériopathie thrombotique isolée à 56% et 57%, respectivement (Fuster, Steele et al. 1984; Bjornsson and Edwards 1985). Suite à ces analyses, une étude histopathologique plus détaillée des lésions vasculaires pulmonaires des patients du registre « National Institutes of Health Pulmonary Hypertension », a pu établir que 33% des 48 patients disponibles avec un artériopathie pulmonaire présentent des lésions thrombotiques (Pietra, Edwards et al. 1989). Étant donné que ces changements ont été trouvés en l'absence de preuve clinique ou pathologique d'embolie pulmonaire, ils étaient considérés comme de la thrombose *in situ*, comme proposé initialement par Bjornsson et Edwards (Bjornsson and Edwards 1985). Ces lésions thrombotiques *in situ* ont aussi été décrites dans les échantillons pathologiques chez des patients HP associées à la prise de drogues (par exemple, Aminorex) et HP portale (Edwards, Weir et al. 1987). Pris ensemble, ces observations indiquent une prévalence relativement élevée de lésions thrombotiques chez les patients HP. Cependant, le rôle exact de la thrombose dans les artères pulmonaires et la micro-vascularisation reste à élucider. Une théorie soutient que l'artériopathie thrombotique est un épiphénomène sous-jacent de l'état hypertensif des vaisseaux pulmonaires et la dysfonction endothéliale des HP. Un autre point de vue est que les lésions thrombotiques organisés au niveau des lésions vasculaires pulmonaires sont deux aspects indissociables du remodelage pulmonaire, rétrécissement vasculaire luminal et une augmentation des RVP qui contribuent à la progression de la maladie. Indépendamment du fait que l'artériopathie thrombotique est une cause ou une conséquence de l'HTAP, l'artériopathie thrombotique participe dans tous les cas à la progression et altère le pronostic de la maladie.

3.1 P-Selectine et Thrombomoduline

Le P-sélectine est une glycoprotéine produite par l'endothélium et les plaquettes. Une augmentation du niveau de P-sélectine est un marqueur de la dysfonction endothéliale et /ou l'activation plaquettaire et peut indiquer la présence d'une hypercoagulabilité (Ruf and Morgenstern 1995). La Thrombomoduline est une protéine produite par des CE, cofacteur membranaire avec une forte affinité pour la thrombine, et qui rend la capacité de l'endothélium à cliver le fibrinogène ou à activer les plaquettes. De plus, la thrombomoduline active rapidement les protéines C.

Le système anticoagulant thrombomoduline/protéine C est réduit dans l'HP à cause d'une augmentation de la thrombomoduline soluble, une anomalie qui peut jouer un rôle dans la

progression de la maladie (Welsh, Hassell et al. 1996). Dans une étude menée au japon sur des patients HTAPi, des patients d'HP associée à une maladie veino-occlusive et des patients d'HP associés à d'autres pathologies, le niveau plasmatique de P-sélectine a été retrouvé augmenté par rapport à une population contrôle. Inversement, le niveau de la thrombomoduline lui a été retrouvé diminué. Après la perfusion d'agoniste de prostacycline, le niveau de P-sélectine s'est vu diminué et le niveau de thrombomoduline augmenté, suggérant que la dysfonction endothéliale participe en partie à la thrombose *in situ* (Sakamaki, Kyotani et al. 2000).

3.2 Le Facteur Von Willebrand (vWF)

Le facteur vWF, une grande glycoprotéine multimérique, est synthétisé par l'endothélium et les mégacaryocytes. Stocké dans les corps Weibel-Palade, il est libéré suite à une perturbation de l'endothélium. Les vWF multimères fonctionnels se lient au collagène dans les zones de lésion vasculaire et initient la formation d'agrégat plaquettaire.
Dans l'HTAPi ou HP associée à une cardiopathie congénitale, les taux plasmatiques et l'activité du facteur vWF sont augmentés significativement. De plus, les auteurs ont observé *in situ* que cette expression est intense au niveau de l'endothélium sur des biopsies des patients HTAP (Rabinovitch, Andrew et al. 1987). De plus, le taux élevé de ce facteur est corrélé au taux de mortalité des patients (Lopes, Maeda et al. 2000).

3.3 Le Système Plasminogène–Plasmine

Les CE sont une source t-PA, un activateur clé du plasminogène dans la cascade fibrinolytique. D'autre part, les CE synthétisent et libèrent également la protéine PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), un inhibiteur du t-PA, soulignant le rôle de l'endothélium dans la régulation de l'équilibre délicat des processus pro-thrombotiques et anti-thrombotiques.
Il y a plusieurs éléments de preuve indiquant que le dysfonctionnement des CE pourrait interférer avec l'équilibre normal du système plasminogène-plasmine : des anomalies du système tissue plasminogen activator (tPA)–plasmin et du système urokinase plasminogen activator (uPA)–plasmin ont été noté (Huber, Beckmann et al. 1994; Christ, Graf et al. 2001; Katta, Vadapalli et al. 2008; Kouri, Queisser et al. 2008). De plus, les CE des artères pulmonaires libèrent le t-PA en réponse à des facteurs et comme le t-PA ne dispose que d'une activité limitée sur le caillot de fibrine préexistant, la production locale et aigue du t-PA joue un rôle majeur dans la fibrinolyse et, par conséquent, dans le maintien de l'état anti-thrombotique dans la circulation pulmonaire. D'autre part, une augmentation des taux de PAI-1 a été trouvée dans le plasma de 17 sur 29 patients HTAPi (Eisenberg, Lucore et al. 1990).

4 Les anomalies Endothéliales Intrinsèques

Les CE sont en permanence sous influence de l'environnement et de leurs cellules avoisinantes. Son comportement change pour s'adapter aux différents facteurs présents et elles peuvent aussi moduler ce propre environnement. En réponse à ces signaux de communication, les CE peuvent soit proliférer, migrer, libérer des facteurs ou même enclencher une apoptose. Dans les vaisseaux, l'endothélium est en permanence sous l'influence de la pression partielle en O_2 (hypoxie), des forces hémodynamiques ou « *shear stress* », d'hormones ou de drogues, de médiateurs de l'inflammation ou de l'auto-immunité. Mais lorsqu'elles sont retirées de cet environnement HTAP, les CE-HTAP isolées des patients maintiennent des anomalies *in vitro*, ce qui suggère qu'elles possèdent des anomalies qui leur sont propres. Nous avons vu que les CE en culture isolées de patients HTAP ont un phénotype altéré avec une production anormale de différents facteurs : tels que des molécules vasoréactives (5-HT, l'ET-1), des chemokines (MCP-1), des facteurs de croissances (FGF2, PDGF, EGF) et une diminution dans la synthèse de NO ou de prostacycline. Les productions anormales de ces facteurs par les CE *in vitro* suggèrent que ces cellules possèdent des anomalies intrinsèques qui lui sont propres dont les mécanismes restent encore à élucider. Cependant, une étude récente a pu mettre un lien étroit entre BMPR-II et activation de la NOS3 (Gangopahyay, Oran et al. 2011) or ce gène est souvent muté ou alors négativement régulé dans les HP. De même, un phénotype hyper-prolifératif et apoptose-résistant a pu être mis en évidence (Masri, Xu et al. 2007), un phénotype anormal lié à une activation persistante du facteur (*signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), et une activation de la protéine de pro-survie Mcl-1.

Ces anomalies intrinsèques peuvent être aussi être liées à des anomalies d'ordre génétique ou chromosomique. Plusieurs études récentes donnent des preuves en ce sens. Il est bien connu que les mutations du gène *BMPR-II* sont impliquées incontestablement dans la pathogenèse de l'HTAP en induisant une apoptose de CE et permettant l'émergence de cellules clonales anormales. Comme la pénétrance du gène muté est incomplète, il existe probablement une implication d'autres gènes comme le décrit récemment le groupe Austin ED *et al.* En ce qui concerne le gène *Caveolin-1*. (Austin, Ma et al. 2012). Par la technique de séquençage exomique, ils ont découverts des mutations de ce gène dans plusieurs cas d'HTAP héritable. Chez ces patients mutés pour ce gène, l'expression de la protéine est diminuée de façon très significative au niveau de l'endothélium. D'autres gènes ont également été décrits : *ACVRL1 (*ALK1*)*, *Smad9 (*Smad8*), Smad1, Smad4*, *alk6* (BMPR1B) et *endoglin* (Chaouat, Coulet et al. 2004; Shintani, Yagi et al. 2009; Girerd, Montani et al. 2010; Nasim, Ogo et al. 2011; Chida, Shintani et al. 2012). Des instabilités des microsatellites et des anomalies chromosomiques ont été également décrites (Yeager, Halley et al. 2001; Aldred, Comhair et al. 2010). Dans cette

dernière étude, des réarrangements chromosomiques au niveau de l'endothélium *in situ* ou *in vitro* ont été trouvés chez 5 des 9 patients HTAPi étudiés. Il existe également des anomalies dans le métabolisme énergétique (« effet Warburg ») et une nette diminution du nombre de mitochondries par CE (Xu, Koeck et al. 2007). Pour résumer, un ensemble d'anomalies intrinsèques a été retrouvé dans les CE HTAP et une meilleure compréhension de ce phénotype endothélial anormal est requise.

MATERIELS ET METHODES

Prélèvements Humains

Les prélèvements pulmonaires humains étudiés dans le présent travail incluent les tissus pulmonaires collectés lors de transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire de patients HTAP. Le tissu contrôle provient de biopsies pulmonaires effectuées lors de la cure chirurgicale de pneumothorax, ou à distance des lésions lors de l'ablation de tumeurs pulmonaires localisées. Chez ces patients, des mesures écho-cardiographiques préopératoires ont été réalisées pour éliminer toute suspicion d'HTAP. Les prélèvements ont été obtenus au Centre Chirurgical Marie Lannelongue sont stockés dans la tissuthèque « HTAPthèque » gérée par le service d'anatomo-pathologie sous la responsabilité du Pr Marc Humbert. Les données cliniques des patients HTAP et des contrôles où ils sont résumés dans le tableau suivant:

	HTAPi n=10	**Contrôles** n=10
Age, années	39.8 ± 2.2	46.4 ± 2.3
Sexe, H/F (ratio)	4 / 6 (0.40)	4 / 6 (0.40)
Mutation du gène *BMPR-II*, n		
Porteur	0	NA
Non-Porteur	10	NA
Classe Fonctionnelle NYHA,		
classe III	4	NA
classe IV	6	NA
PAPm, mmHg	69.9 ± 2.1	NA
IC, l/min/m²	2.6 ± 0.1	NA
PVRi, mmHg/l/min/m²	14.6 ± 0.6	NA
PCWP, mmHg	8 ± 0.5	NA

Afin de garantir l'intégrité nucléique, protéique et morphologique des tissus utilisés, les poumons explantés par le chirurgien sont traités rapidement et stérilement. Les blocs de tissu pulmonaire ainsi obtenus sont stockés -80°C jusqu'à leur utilisation, une partie sert à isoler les cellules. Les études réalisées sur ces prélèvements ont reçu l'approbation du Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII, Le Kremblin-Bicêtre, France). Un consentement libre et éclairé est obtenu des patients ou de leur famille, avant chaque prélèvement opéré à des fins de recherche médicale.

Isolements de Cellules Endothéliales Micro-vasculaires

L'isolement des CE micro-vasculaires pulmonaires se fait en deux étapes : une dissociation tissulaire par une digestion enzymatique puis une sélection spécifique par un anticorps

monoclonal anti-CD31 humain couplé sur à des billes ferromagnétiques. Brièvement, un parenchyme pulmonaire dépourvu de sa plèvre est mis en digestion. La suspension est ensuite filtrée et cultivée dans une boîte de pétrie préalablement coatée avec 0,1% gélatine, avec du milieu complet : milieu MCDB-131, L-Glutamine, Héparine, Pénicilline/Streptomycine, Fungizone, Hepes, 10% sérum du veau fœtal, 10µg/ml VEGF et 1µg/mL ECGS. Après 48h, une purification immunomagnétique des CE-P est réalisée avec des billes ferromagnétiques couplées avec un anticorps anti-CD31.

Afin d'évaluer et de caractériser les cultures primaires ainsi obtenues, les CE-P sont marquées sélectivement par incorporation de la lipoprotéine acétylée de basse densité couplée à une sonde carbocyanine fluorescente (Dil-Ac-LDL) (Figure 22). Parallèlement, un co-marquage a été effectué avec *Ulex europaeus agglutinine-1* (UAE-1, Sigma Aldrich, France), une lectine conjuguée au FITC qui reconnaît spécifiquement un récepteur endothélial. L'évaluation de la pureté de nos cultures est effectuée à l'aide du rapport : nombre de cellules positives au Dil-Ac-LDL divisé par le nombre total de cellules. Les cellules utilisées dans nos expériences sont positives au Dil-Ac-LDL à 97%. Les contaminants cellulaires observés ont le plus souvent une forme cellulaire proche des cellules mésenchymateuses.

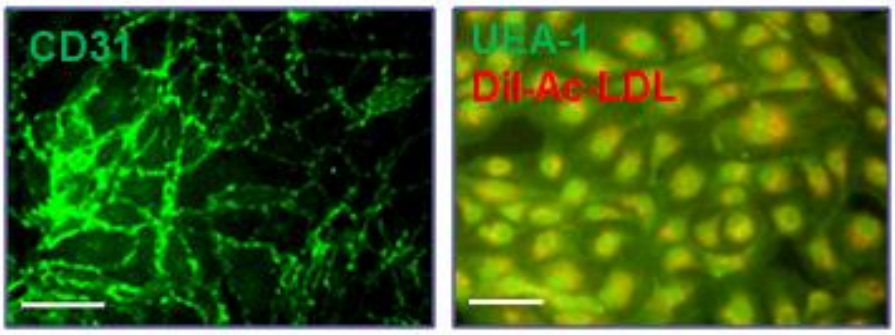


FIGURE 22 : *Immunomarquages de CD31, UAE-1 et l'incorporation de Dil-Ac-LDL par des CE*

Isolements de Cellules Musculaires lisses d'Artères Pulmonaires

La mise en culture des CML-AP se fait par la technique d'explant à partir des artères pulmonaires obtenues lors de la chirurgie. Brièvement, les artères pulmonaires (3 à 5mm de diamètre) sont prélevées lors de la chirurgie. La couche adventitielle résiduelle est éliminée. La zone médiale, ainsi disséquée, est mis en culture dans une boite de pétri avec un milieu DMEM supplémenté de 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'amphotéricine, de l'Hepes, 0.5% d'insuline, d'EGF et 15% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les CML prolifèrent après 2 semaines puis elles sont trypsinées et amplifiées.

Pour caractériser les cultures primaires de CML-AP obtenues, les cellules de chaque culture sont évaluées quant à leur expression en protéines du cytosquelette et en protéines responsables du phénotype contractile spécifique du muscle lisse, incluant l'αSM-actine, la desmine et la vinculine en utilisant un marquage immun-fluorescent.

Modèles Expérimentaux d'HTAP

Les études sur des animaux ont été approuvées par la commission administrative sur les soins des animaux au Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

- **HP Induite par l'Hypoxie chez la Souris**

Le modèle expérimental utilisé dans ce travail est le modèle d'HP induite chez la souris par l'exposition à l'hypoxie normobarre (FiO_2 10%). Les groupes randomisés des animaux sont placés en hypoxie pendant 21 jours, les groupes témoins sont placés en normoxie (FiO2 21%) durant la même période. Des souris C56Bl/6j mâles âgées de 6 semaines ont été utilisées dans cette étude.

Les paramètres hémodynamiques mesurés comprennent entre autres la pression systolique du ventricule droit. Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (60mg/kg), de xylazine (8mg/kg) et d'acépromazine (0.5mg/kg). La veine jugulaire droite est disséquée et un cathéter de 24 gauges est introduit dedans sur environ 2-3 cm, ce qui le place dans le ventricule droit. Le cathéter est relié à un bloc d'enregistrement constitué d'une tête de pression, d'un amplificateur et d'un enregistreur pour mesurer la pression systolique du ventricule droit.

L'évaluation de l'HTAP se fait sur trois critères indissociables :

- L'étude des paramètres hémodynamiques avec la mesure de la pression systolique du ventricule droit.
- La quantification de l'hypertrophie ventriculaire droite avec le calcul de l'index cardiaque Fulton (rapport du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche + septum)
- L'étude histologique des coupes de poumons avec la quantification de la muscularisation des artères pulmonaires distales d'un diamètre inférieur à 200µm.

- **HP induite par la Monocrotaline chez le Rat**

Des rats de la souche Wistar âgés de 4 semaines (100-120g) sont utilisés dans nos études. Ces animaux sont fournis par le Centre d'élevage Janvier et entrent dans le protocole 1 semaine après l'arrivée dans notre animalerie. Le protocole est illustré dans le schéma ci-dessous (Figure 23).

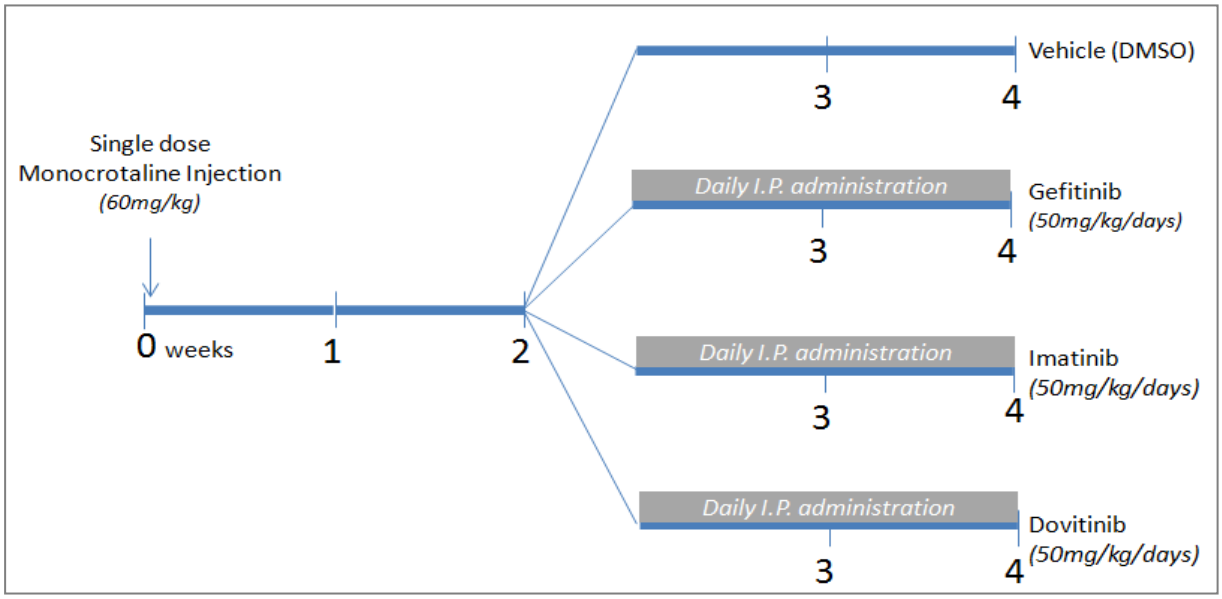


FIGURE 23: *Stratégie expérimentale utilisée pour tester l'effet curatif du Géfitinib, de l'Imatinib et du Dovitinib dans le modèle expérimental d'HP induite par l'administration de monocrotaline.*

Après 4 semaines, les paramètres hémodynamiques sont mesurés et les prélèvements cardio-pulmonaires sont pris. Les rats sont mis sous anesthésie gazeuse à l'isofurane. La veine jugulaire droite est disséquée et un cathéter polyvinyle 24 gauges est introduit pour atteindre le ventricule droit puis l'artère pulmonaire. Le débit cardiaque est mesuré grâce à un procédé de thermodilution. Une sonde thermique est introduite via la carotide pour atteindre le cœur gauche. Cette sonde va nous permettre de mesurer la baisse de température apportée par l'injection d'une solution de sérum physiologique froide via la veine jugulaire. Les données sont intégrées à l'appareil PowerLab 4/35 (ADinstruments Limited, Oxford, Royaume-Unis) et sont analysées avec le logiciel LabChart Pro.

L'évaluation de l'HP induite chez le rat se fait sur trois critères indissociables :

- L'étude des paramètres hémodynamiques avec la mesure de la pression systolique du ventricule droit et de la pression artérielle pulmonaire moyenne.
- La quantification de l'hypertrophie ventriculaire droite avec le calcul de l'index cardiaque Fulton (rapport du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche + septum)
- L'étude histologique des coupes de poumons avec la quantification de la muscularisation des artères pulmonaires distales d'un diamètre inférieur à 200µm.

Etude de l'Expression Génique

L'expression génique est effectuée par la PCR quantitative en temps réel avec la technologie « Taqman » sur l'appareil StepOne Plus (Applied Biosystems).

- **Principe de la PCR Quantitative**

Le principe (Figure 24) de cette chimie repose sur la fonction exonucléase 5'->3' de la Taq-polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique de la séquence amplifiée, placée entre les deux primers. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé «reporter» et en 3' par un autre type de fluorochrome appelé «quencher». Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est atténuée ou «quenchée» par la proximité du quencher. Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la Taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter est alors détectable. L'augmentation du signal correspondant à l'émission du fluorophore reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

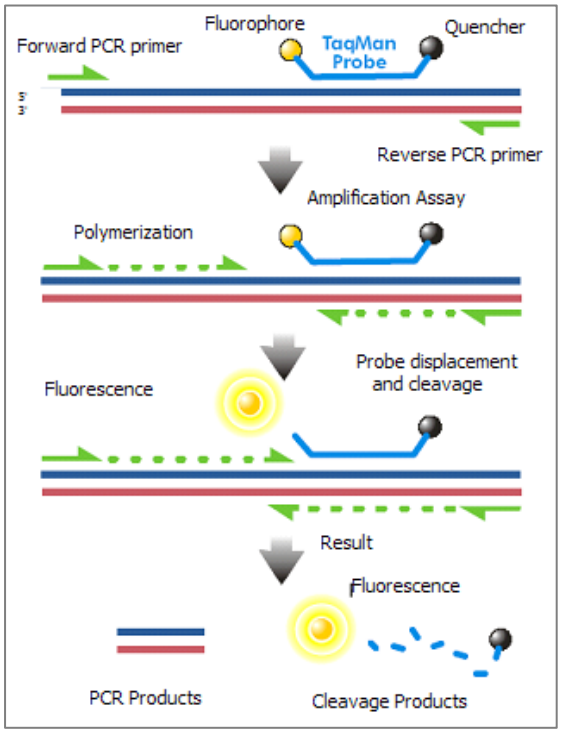


FIGURE 24 : *Principe de la technologie Taqman*

- **Extraction d'ARNm et Rétro-Transcription**

L'extraction d'ARNm s'effectue sur les tissus de poumons ou sur les cellules isolées à l'aide des kits en colonne. Brièvement, l'échantillon est lysé dans un tampon puis les acides ribonucléiques sont précipités à l'aide d'une solution d'alcool. Les ARN totaux sont filtrés puis élués. Pour vérifier leur intégrité, une migration sur gel d'agarose est réalisée. Les quantifications d'ARN sont faites par spectrométrie en UV sur le Nanodrop. Les échantillons dont le ratio 230/260nm inférieur à 1,8 sont éliminés puis ré-extraient. Une quantité de 2µg d'ARN est utilisé par la conversion d'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

- **PCR et Quantification**

L'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée selon la méthode relative du ΔΔCt. Le 18S a été utilisé comme contrôle interne dans chaque réaction de PCR. Le gène cible normalisé par rapport au 18S correspond à ΔCt (Ct du gène d'intérêt – Ct du 18S). La différence d'expression de chaque échantillon est donné par la différence ΔΔCt (ΔCt de l'échantillon – ΔCt d'un

échantillon de référence) Enfin, la quantité relative de chaque échantillon est donnée par l'équation $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. La PCR est réalisée en duplicata avec 10ng d'ADNc et en duplex.

Etude de l'Expression Protéique

L'évaluation des protéines d'intérêt se fait par principalement par la technique du Western blot. Les culots cellulaires ou pulmonaires ont été lysés et homogénéisés dans un tampon composé d'antiprotéases et d'antiphophatases. Après détermination de la concentration protéique par la technique de Bradford, 50µg de chaque échantillon ont été déposés dans un gel SDS-Acrylamide pour une séparation protéique par électrophorèse en fonction de la taille. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane nitrocellulose suivi d'une étape de saturation avec une solution composée de 5% de lait dilué dans TTBS (*Tween-Tris Buffered Saline*) pendant 1H. La révélation des protéines d'intérêt a été réalisée par l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques de celle-ci Bcl2 1/500ème, Bax 1/200ème Bcl-xL 1/1000ème p130cas, Phospho-p130cas, pErk1/2, Phospho-pERK1/2, FGFR2, FGFR1, MIF, CD74, ou β-actine 1/5000ème (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) exposés pendant une nuit au froid. Nous avons ensuite utilisé les anticorps secondaires adéquats couplés à l'enzyme HRP (*Horseradish peroxidase*) exposés pendant 1H. Après lavage, nous avons révélé nos membranes avec un système de chimioluminescence ECL (GE Healthcare, Vélizy, France) et l'appareil ChemiDoc^{TM} XRS System (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France) pour détecter les signaux. L'intensité des bandes a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageLab (Bio-rad). Les résultats pour chaque protéine d'intérêt sont présentés sous forme de rapports calculés en fonction de la protéine de ménage β-actine.

Immuno-Marquages

Les poumons sont insufflés par une solution de formaldéhyde via la trachée et incubés dans cette même solution pendant 24H. Ils sont ensuite déshydratés pendant une suite dans des solutions d'alcool successives puis inclus en paraffine selon une méthode standard. Des coupes histologiques de 5µm d'épaisseur sont réalisés puis soit colorées l'étude histologique standard soit utilisé pour les immuno-marquages.

- **Marquage de Prolifération PCNA**

L'antigène PCNA est une protéine de 36kDa situé dans le noyau des cellules. Cette protéine participe à l'initiation de la prolifération via l'ADN polymérase. Son expression est corrélée avec l'activité mitotique des cellules, ce qui permet de l'utiliser comme marqueur de prolifération. Le marquage immunohistochimique est effectué avec le *Zymed PCNA staining Kit*. Les coupes de

poumon sont déparaffinées et réhydratées. L'activité de la péroxydase endogène est bloquée par de l'eau oxygénée 3% dans du méthanol. Pour augmenter la spécificité du marquage, l'anticorps monoclonal anti-PCNA biotinylé est dilué dans une solution BSA. La streptavidine-péroxydase est utilisée pour générer le signal avec le DAB (diaminobenzidine tétrahydrochloride) qui donne une coloration brun foncé des noyaux. La contre-coloration est effectuée avec l'hémalun (bleu violacé). Les lames sont déshydratées puis montées en milieu non aqueux (Histomount). Des marquages PCNA ont été effectués en fluorescence grâce à l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-souris.

- **Tests d'Apoptose**

La méthode TUNEL (Terminal-deoxyribonucleotidyl-UTP-Nick-End-Labeling) a été décrite par Gavvrieli et al, 1992. L'haptène utilisée pour l'amplification varie, la biotine étant remplacée par la digoxygénine. Cette méthode est appliquée avec le kit *Apopdetect péroxydase plus*. Même si la spécificité de la caractérisation apoptotique est remise en cause, la méthode permet de constater une dégradation de l'ADN des cellules synonyme de la mort cellulaire. Le protocole de marquage est classique excepté pour la réaction enzymatique TdT (Terminal-deocyribonucléotidyl-Tranférase) qui ajoute des nucléotides UTP-digoxygénine aux extrémités $3'^{OH}$ libres des brins d'ADN. Après arrêt de la réaction par un tampon spécifique, un conjugué anti-digoxygénine couplé à un fluorochrome est mis en présence des coupes.
Les résultats obtenus en marquages PCNA et en marquages TUNEL sont exprimés sous forme de pourcentages du nombre de noyaux marron sur le nombre de noyaux totaux comptés (noyaux marron + noyaux bleus). L'évaluation de ce pourcentage a été réalisée sur l'analyse d'un minimum de quinze artères pulmonaires différentes sur cinq patients témoins ou atteints d'HTAP idiopathique

- **Marquages Immunohistochimiques**

Les marquages de protéines pulmonaires sont effectués en colorimétrique à partir des coupes paraffinées de 5µm. Les lames sont d'abord déparaffinées puis réhydratées. Le démasquage d'antigènes se fait dans un bain de 95°C de tampon citrate. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par de l'eau oxygénée 3%. Les anticorps sont exposés au tissu après une étape de saturation au BSA 5%. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont utilisés pour la révélation avec le DAB. Contre-colorées avec l'hématoxyline, les lames sont ensuite montées.

- **Marquages Immunoflurorescents**

Les marquages immunofluorescents se font également sur des lames paraffinées de 5 µm. Brièvement, les lames sont déparaffinées, réhydratées puis les antigènes sont démasqués avec

le tampon citrate. Les anticorps sont exposés au tissu pendant une nuit après la saturation au BSA. Ces marquages sont réalisés pour un antigène cible en parallèle d'un anticorps anti-vWF qui permet de localiser l'endothélium. Apres lavages, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome rouge et un autre couplé à un autre fluorochrome vert sont utilisés pour reconnaitre la protéine cible et le vWF. La lame est montée avec une solution de Dapi pour localiser la morphologie pulmonaire. Les observations ont été faites en microscopie confocale (Zeiss LSM700, Zeiss, Le Pecq, France).

- **Marquages Immunocytologiques**

Les CML ou CE ont été ensemencées avec un milieu complet sur des lames en verre pré-coatées à la gélatine. Après fixation avec du méthanol, les cellules ont été perméabilisées au triton puis saturées à la BSA avant d'être exposée aux différents anticorps pendant une nuit. Ensuite, les différents anticorps secondaires fluorescents sont utilisés respectivement contre les anticorps primaires. Un montage avec du Dapi est effectué avant les observations au microscope confocal ZEISS LSM700.

Tests d'Apoptose par FACS

Afin de distinguer la population de cellules en apoptose de cellules vivantes, nous utilisons un phénomène précoce et spécifique de l'apoptose faisant intervenir la délocalisation de phosphatidylsérines membranaires. En effet, ces molécules sont situées exclusivement sur la face interne de la membrane cytoplasmique des cellules vivantes alors que lors de l'apoptose, une partie de ces molécules sont présentes à face externe de la membrane. Ces phosphatidylsérines sont reconnues par un anticorps anti-Annexin V (AnnV). Un double marquage avec un intercalant d'ADN, l'iodure de Propidium, est utilisé pour distinguer les cellules mortes par nécrose. Au final, nous obtenons ainsi quatre possibilités de marquage : $AnnV^-IP^-$ pour des cellules vivantes ; $AnnV^+IP^-$ pour des cellules en apoptose ; $AnnV^+IP^+$ pour des cellules mortes tardives ; et $AnnV^-IP^+$ pour des cellules nécrosées.

L'analyse a été réalisée par Cytométrie de Flux (FACS) sur l'appareil CyAn^{Tm} Dako Cytomation (Dako France SAS, Trappes, France). Le marquage des cellules a été réalisé à l'aide d'un kit (BD Biosciences Pharmingen) selon les procédures fournies par le fournisseur. Brièvement, les cellules sont trypsinées et lavées à deux reprises avec du PBS. Le culot cellulaire obtenu est ensuite dilué à une concentration de 1.10^6 cellules/mL. Un mélange composé de 5µL Annexine V -FITC et 5µl d'IP sont mis en présence avec 100µl de suspension cellulaire. Les résultats sont représentés sous forme de pourcentage pour chacun des marquages par rapport au nombre total de cellules analysées.

Etude de Prolifération Cellulaire

- **Evaluation de la Prolifération par l'Incorporation de BrdU**

Cette technique évalue la quantité de Bromodeoxyurédine (BrdU) qui est incorporé par la cellule lors de la synthèse d'ADN génomique en cas de prolifération. Brièvement, les cellules sont ensemencées à une même densité en plaques 96 puits. Apres une nuit, les cellules sont synchronisées puis stimulées à différentes conditions avec du milieu contenant du BrdU. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées après une stimulation de 24H puis immuno-marquées à l'aide d'un anticorps anti-BrdU couplé à un fluorochrome Europium. Une mesure de l'intensité de la fluorescence est faite sur l'appareil Envision (Perkin Elmer).

- **Evaluation par Comptage Cellulaire**

Parallèlement à la méthode de la prolifération par l'incorporation de BrdU, une évaluation par comptage cellulaire est également effectuée. Les cellules sont ensemencées dans des puits de diamètre de 24mm à 10 000 cellules par puits. Après 24H, les cellules sont stimulées à différentes conditions. Après 48H, les cellules ont été trypsinées puis comptées à l'aide des lames de Malassez.

Transfection Cellulaire

Afin de réduire l'expression d'une protéine spécifique, nous avons utilisé la technique de siRNA. Il s'agit d'une petite séquence oligonucléique d'une vingtaine de base simple brin capable de se lier à une séquence d'ARNm et d'empêcher ainsi sa traduction.

Dans nos études, les siRNA ont été transfectés dans nos cellules à l'aide d'un liposome commercial Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Parallèlement à des siRNA de gènes cibles, siRNA-FGF2, siRNA-BCL2, siRNA-BCL-xL et siRNA-p130^{cas}, un siRNA-contrôle a été également utilisé. Les cellules transfectées sont utilisées dans les 3 jours. Des Western blot sont effectués pour vérifier et quantifier l'absence de ces protéines.

Etude de la Migration Cellulaire

Pour étudier la migration cellulaire en réponse à un facteur chemotactique, des chambres de Boyden ont été utilisées. Ceci consiste à mesurer le passage de la cellule de la surface de la membrane à la phase inférieure de celle-ci composée de pores de 8µm de diamètre. Brièvement, une même densité de cellules est mise en culture sur une membrane

préalablement coatée à la gélatine. Apres l'adhésion des cellules (une nuit d'incubation) à la surface de la membrane, des facteurs étudiés sont placés dans la partie inférieure de la chambre pendant 6H. En réponse ou non à ces facteurs, les cellules vont alors migrées plus ou moins vite à travers cette membrane. Le comptage cellulaire après une coloration HE (Hématoxyline Eosine) permet de quantifier le chimiotactisme de chacun des facteurs étudiés.

Dosages ELISA

Pour mesurer les protéines circulantes au niveau des surnageants cellulaires ou au niveau sérique, la technique ELISA a été utilisée avec des kits fournis par R&D systems. Les sérums ont été recueillis par l'équipe clinique et conservés à 80°C. Les données cliniques de ces patients sont résumées dans le tableau ci-dessous. Les surnageants de culture ont été obtenus à partir des cultures cellulaires ensemencés à 300 000 cellules/10cm² avec 1mL de milieu adapté pendant 24H.

	HTAP n=37	**Contrôles** n=40
Age, années	50.4 ± 2.7	41.9 ± 2.1
Sexe, H/F (ratio)	10 / 27 (0.37)	19 / 21 (0.9)
Mutation du gene *BMPR2*, n		
Porteur	16	NA
Non-porteur	21	NA
Classe fonctionnelle NYHA, n		
classe I	1	NA
classe II	24	NA
classe III	12	NA
6-MWD, m	445 ± 20	NA
PAPm, mmHg	49.3 ± 2.4	NA
IC, l/min/m²	3.10 ± 0.16	NA
PVRi, mmHg/l/min/m²	8.7 ± 0.7	NA
PCWP, mmHg	7.6 ± 0.7	NA
Thérapie Spécifique de l'HTAP		
- ERA	31	NA
- PDE5i	27	NA
- Prostanoids	16	NA
- CCB	7	NA
- Sans Traitement	0	NA

Etude de la Migration Cellulaire

Pour étudier la migration cellulaire en réponse à un facteur chemotactique, des chambres de Boyden ont été utilisées. Ceci consiste à mesurer le passage de la cellule de la surface de la

membrane à la phase inférieure de celle-ci composée de pores de 8µm de diamètre. Brièvement, une même densité de cellules est mise en culture sur une membrane préalablement coatée à la gélatine. Apres l'adhésion des cellules (une nuit d'incubation) à la surface de la membrane, des facteurs étudiés sont placés dans la partie inférieure de la chambre pendant 6H. En réponse ou non à ces facteurs, les cellules vont alors migrées plus ou moins vite à travers cette membrane. Le comptage cellulaire après une coloration HE (Hématoxyline Eosine) permet de quantifier le chimiotactisme de chacun des facteurs étudiés.

Analyses Statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne +/- SEM (somme des écarts à la moyenne). La différence entre deux groupe est déterminée par le test t de Student pour des valeurs appariées ou non-appariées. Dans le cas de multiples comparaisons de moyennes, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée, suivi d'une comparaison post hoc en utilisant la méthode Bonferonni. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

HYPOTHESES DE TRAVAIL :

Une restitution du phénotype aberrant de la CE pulmonaire devrait limiter la progression et/ ou régresser le remodelage artériel pulmonaire associée à l'hypertension pulmonaire.

OBJECTIFS :

Mon travail de Doctorat a visé à préciser et comprendre le phénotype anormal de la CE pulmonaire de patients HTAP afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques adéquates pour corriger et restaurer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle pulmonaire.

Cette orientation a non seulement été guidée par les conclusions de plusieurs travaux menés par notre groupe mais également par deux autres observations majeures :

1) La CML prolifère lorsqu'elle est en contact avec le milieu des CE pulmonaires et cela est d'autant plus marqué lorsque les CE sont d'origine de patients ayant une HTAP. C'est ainsi que nous avons identifié l'ET-1 et 5-HT comme deux facteurs paracrines endothéliaux importants dans cette réponse.

2) La mise en évidence de la synthèse accrue du *fibroblast growth factor* (FGF)-2 par les CE dans l'HTAP et son rôle majeur dans le développement de l'HTAP. En effet l'inhibition de FGF2 par une approche siRNA non seulement protège mais également réverse l'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat.

3) Une simple altération endothéliale sélective chez la souris, perte du facteur de transcription PPAR-gamma dans les CE, est suffisante pour initier un remodelage artériel pulmonaire et induire un phénotype modéré d'HP.

L'ensemble de ces constatations souligne le rôle central des CE dans l'HTAP et soulève un certain nombre de questions qui ont fait l'objet des différents travaux de ce travail de thèse et qui sont résumés ci-après.

Autocrine FGF2 Signaling Contributes to Altered Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY

2011 Aug;45(2):311-22. Epub 2010 Oct 29.

Introduction

Plusieurs travaux ont suggéré des défauts de balance entre prolifération/apoptose des CE pulmonaires dans les modèles animaux et lésions humaines, cependant le(s) mécanisme(s) sous-jacents mis en œuvre reste totalement inconnu. Notre groupe a récemment démontré une surexpression du FGF2 par les CE pulmonaires HTAP qui joue un rôle important dans l'hyperplasie du muscle lisse (Izikki, Guignabert et al. 2009). Le FGF2 est connu pour avoir aussi bien des actions paracrines qu'autocrines et il représente un facteur endothélial à fort pouvoir prolifératif et de survie (Goncalves 1998).

Hypothèse

Par conséquent, nous avons testé si le FGF2 peut, au moins en partie, contribuer à l'acquisition et à la maintenance du phénotype anormal des CE–HTAP.

Principaux résultats et Discussion

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord évalué la prolifération et l'apoptose endothéliale *in situ* au sein d'artères pulmonaires HTAPi et contrôles. Nous avons ainsi pu quantifier la balance prolifération/apoptose et voir que l'endothélium HTAPi présente de 2 à 3 fois plus de CE en prolifération et environ 2 fois moins de CE en apoptose qu'un endothélium contrôle. De manière très interressante, nous avons pu démontrer que ces anomalies se maintenaient *in vitro* en dehors toute influence environnementale : les CE HTAP prolifèrent plus que des CE contrôle à l'état basal, et ceci est d'autant plus vrai que les CE HTAP sont cultivées en présence de pourcentages de SVF croissants ; en revanche les CE HTAP et contrôles présentent des taux d'apoptose équivalents à l'état basal, mais lorsque l'apoptose est induite les CE HTAP sont plus résistantes que les CE contrôles à l'induction d'apoptose. Ce phénomène de résistance à l'apoptose a pu être vérifié à l'aide de 3 stimuli d'induction d'apoptose : la déprivation en sérum, l'exposition à l'hydrogène peroxide (H_2O_2) ou au cycloheximide.

Nous avons également pu démontrer qu'un facteur soluble est présent dans les surnageants de cultures des CE HTAP et qu'il est à l'origine de ce phénotype anormal. En effet, lorsque ce surnageant conditionné par des CE HTAP est placé sur des culture de CE contrôle, il induit une prolifération élevée et une résistance à l'apoptose. Nous avons donc voulu vérifier si l'un de ces facteurs pouvait être le FGF2 et pour cela, nous avons utiliser une stratégie de siRNA. La normalisation de la production endothéliale de FGF2 par siRNA-FGF2 résulte en une nette diminution de la prolifération et ré-augmente la sensibilité à l'apoptose de CE HTAP.

Dans ce même travail, nous avons pu également mettre en évidence que les CE HTAPi présentaientt une activité constitutive de la voie des *mitogen activated protein kinase* (MAPK), avec des niveaux de ratio phosphoERK1/2 : ERK anormalement élevé par rapport à des CE contrôles. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence des surexpressions de facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL dans les CE HTAP *in situ* et *in vitro*. Nous avons démontré que ces anomalies étaient induites par des boucles autocrines de FGF2. En effet, la normalisation de la production endothéliale de FGF2 résulte en une normalisation des niveaux d'activité de la voie MAPK et restitue l'expression des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL à des niveaux similaires à ceux observés dans les CE contrôles.

Conclusions

En conclusion, ce travail a notamment permis de quantifier les défauts de balance prolifération/ apoptose des CE HTAP *in situ* et *in vitro* et a permis d'identifier au moins un mécanisme à l'origine du phénotype anormal de la CE HTAP.

Autocrine Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Contributes to Altered Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension

Ly Tu[1,2], Laurence Dewachter[3], Benoit Gore[1], Elie Fadel[1,2], Philippe Dartevelle[1,2], Gérald Simonneau[1,2,4], Marc Humbert[1,2,4], Saadia Eddahibi[1,2], and Christophe Guignabert[1,2]

[1]INSERM U999, Le Plessis-Robinson, France; [2]University of Paris-Sud 11, Orsay, France; [3]Free University of Brussels, Brussels, Belgium; and [4]AP-HP, Hôpital Antoine-Béclère, Clamart, France

Pulmonary vascular remodeling is key to the pathogenesis of idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). We recently reported that fibroblast growth factor (FGF)2 is markedly overproduced by pulmonary endothelial cells (P-ECs) in IPAH and contributes significantly to smooth muscle hyperplasia and disease progression. Excessive FGF2 expression in malignancy exerts pathologic effects on tumor cells by paracrine and autocrine mechanisms.We hypothesized that FGF2 overproduction contributes in an autocrine manner to the abnormal phenotype of P-ECs, characteristic of IPAH. In distal pulmonary arteries (PAs) of patients with IPAH, we found increased numbers of proliferating ECs and decreased numbers of apoptotic ECs, accompanied with stronger immunoreactivity for the antiapoptotic molecules, B-cell lymphoma (BCL)2, and BCL extra long (BCL-xL) compared with PAs from control patients. These *in situ* observations were replicated *in vitro*, with cultured P-ECs from patients IPAH exhibiting increased proliferation and diminished sensitivity to apoptotic induction with marked increases in the antiapoptotic factors BCL2 and BCL-xL and levels of phosphorylated extracellular signal-regulated (ERK)1/2 compared with control P-ECs. IPAH P-ECs also exhibited increased FGF2 expression and an accentuated proliferative and survival response to conditioned P-EC media or exogenous FGF2 treatment. Decreasing FGF2 signaling by RNA interference normalized sensitivity to apoptosis and proliferative potential in the IPAH P-ECs. Our findings suggest that excessive autocrine release of endothelial-derived FGF2 in IPAH contributes to the acquisition and maintenance of an abnormal EC phenotype, enhancing proliferation through constitutive activation of ERK1/2 and decreasing apoptosis by increasing BCL2 and BCL-xL.

Keywords: endothelium; growth factors; survival; proliferation; FGF-receptors

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease in which obstructive remodeling of the pulmonary arteries (PAs) leads to progressive elevation of pulmonary vascular resistance (PVR) causing an impedance of right ventricular outflow, resulting in dyspnea, fatigue, chest pain, and syncope (1). One of the most severe forms is idiopathic PAH (IPAH), which is characterized by a marked increase in PVR, eventuating in progressive right heart failure and death within 5 years after the diagnosis (1, 2). The pulmonary vascular remodeling of PAH includes concentric medial thickening of the distal PAs, neo-muscularization of previously nonmuscular capillary-like vessels, structural wall changes in larger PAs, and the development of complex vascular structures known as plexiform lesions. The remodeling process involves all three vessel wall layers (adventitia, media, and intima) and all vessel wall cell types (endothelial cells [ECs], smooth muscle cells [SMCs], fibroblasts, inflammatory cells, and platelets). However, although the histopathology of IPAH has been extensively documented, the mechanisms underlying the progressive obliteration of the distal PAs remain incompletely understood (3–5).

ECs play a central role in vascular homeostasis, and recent research has established that endothelial dysfunction contributes to the structural changes that characterize PA remodeling (6–10). Loss of endothelial-peroxisome proliferator-activated receptor type γ (PPARγ) in mice results in muscularization of PA and PAH (8). Our group has shown that pulmonary ECs from patients with IPAH release excessive amounts of soluble growth factors able to act on SMCs (6, 7, 9). Paracrine overproduction of serotonin, endothelin-1 (6), and fibroblast growth factor (FGF)2 (9) contribute to the increased SMC proliferation that characterizes PAH.

Our recent findings highlight a major role for FGF2 in the cross talk between P-ECs and SMCs in the pathobiology of PAH. FGF2 is markedly overproduced by P-ECs in IPAH and contributes significantly to SMC hyperplasia and disease progression in humans and rodents (9). FGFs have been implicated in the proliferation, migration, survival, and differentiation of many cell types, including ECs (11–14). Accentuated FGF2 expression has been documented in malignancies, whereby FGF2 acts on tumor cells via paracrine or autocrine mechanisms (15). Furthermore, FGF2 binds heparan sulfate proteoglycans and heparin, thereby establishing a biological reservoir that can be released locally in a regulated manner (16, 17). This suggests that, in addition to the paracrine effect recently demonstrated in the PA-SMC, the excess FGF2 observed in PAH might modulate the P-EC phenotype via separate autocrine effects.

Therefore, we hypothesized that autocrine overproduction of EC-derived FGF2 contributes to the acquisition and maintenance of a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype in P-ECs in patients with IPAH.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile-de-France, Le Kremlin-Bicêtre, France). All patients gave informed consent before the study.

Study Population

Lung specimens were obtained at the time of transplantation from 10 patients with IPAH (Table 1) at the Marie Lannelongue Hospital,

(*Received in original form July 29, 2010 and in final form October 20, 2010*)

This research was supported by grants from INSERM, the Legs Poix (Chancellerie des Universités de Paris), and the National Agency for Research (grant no. P007948 ANR-GENOPATH "ATOL").

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Christophe Guignabert, Ph.D; INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133 avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis-Robinson, France. E-mail: christophe.guignabert@inserm.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournal.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 45. pp 311–322, 2011
Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2010-0317OC on October 29, 2010
Internet address: www.atsjournals.org

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF CONTROL AND PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION BEFORE LUNG TRANSPLANTATION

Characteristics	Control Patients	IPAH Patients
Male/female	3/7	3/7
Age, yr, median (range)	41 (20–54)	34 (18–47)
NYHA functional class III	NA	2
NYHA functional class IV	NA	8
mPAP, mm Hg	NA	60 ± 4
PVR, dyne/s/cm^5	NA	1,130 ± 136

Definition of abbreviations: IPAH = idiopathic pulmonary arterial hypertension; mPAP = mean pulmonary artery pressure; NA = not applicable; NYHA = New York Heart Association; PVR = pulmonary vascular resistance.

Le Plessis-Robinson, France. Patients with mutations in the *bone morphogenic protein-receptor* II (*BMPRII*) or *activin-like kinase-type 1* (*ALK-1*) genes were excluded. Control lung specimens were obtained from patients without evidence of pulmonary vascular disease who underwent lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer, with the normal tissue collected at a distance from the tumors.

Human P-EC Isolation, Culture, and Treatment

Human P-ECs were isolated and cultured as previously described (7). For apoptosis induction, P-ECs were placed in serum-free medium for 24 or 48 hours or incubated for 16 hours in medium with 0.5% FCS in presence of cycloheximide, H_2O_2, or vehicle. Additional studies were performed in the presence of human recombinant FGF2 (rHu-FGF2) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) conditioned media (diluted in serum-free media; 2:3) from control or IPAH P-ECs, PD98059 (25 μM) (Sigma-Aldrich), or FCS in the concentrations stated in the legends.

siRNA Transfection

To suppress BCL2, BCL-xL, or FGF2 expression, P-ECs were transfected using lipofectamine RNAiMAX with 100 nM of BCL2-, BCL-xL-, or FGF2 siRNA or with a scrambled sequence (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The cells were studied within 3 days after transfection. Suppression of BCL2, BCL-xL, or FGF2 levels was documented 72 hours after transfection.

AnnexinV-FITC Assay

Floating cells were collected and combined with adherent cells harvested by trypsin/EDTA treatment and then stained with the Annexin V-FITC (BD Biosciences, Pont-de-Claix, France). In each sample, at least 10,000 cells were counted by FACS analysis.

Cell Proliferation Assays

EC proliferation was measured by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation and by cell counting. BrdU staining was measured by the DELFIA Cell proliferation kit (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) and a time-resolved fluorometer EnVisionTM Multilabel Reader (PerkinElmer).

Cells were counted using a Neubauer hemocytometer (American Optical Company, Buffalo, NY) with trypan blue dye exclusion.

Total RNA Isolation and Real-Time QuantitativePCR

The mRNA expression of Bax, BCL2, BCL-xL, FGF2, and FGF receptors was measured by real-time quantitative PCR as previously described (18).

Western Immunoblot and Immunostaining

P-ECs were homogenized and sonicated in PBS containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein extract (50 μg) was used to detect BCL2, BCL-xL, phosphoERK1/2, ERK2 (1:250) (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), or Bax protein (1:1,000) (Euromedex, Mundolsheim, France) by SDS-PAGE was performed as previously described (18). FGF2 protein levels were measured in the conditioned media using an ELISA kit (R&D Systems, Lille, France).

For immunochemistry, paraffin sections were incubated overnight at 4°C with antibodies to BCL2, BCL-xL (1:50), von Willebrand factor (vWF), or proliferating cell nuclear antigen (PCNA; 1:200; Dako, Trappes, France) as previously described (18). We conducted terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) using the ApopTag red *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon, Molsheim, France) (19).

Statistical Analyses

Values of each variable are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was tested using the nonparametric Mann-Whitney test or two-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test. Values were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Increased Proliferation and Decreased Apoptosis of Pulmonary EC in Patients with IPAH Is Associated with Increased Endothelial Expression of BCL2 and BCL-xL

To determine the degree of EC apoptosis in the lungs of patients with IPAH, we performed immunohistochemistry on lung specimens from 10 patients with IPAH and 10 control subjects (Table 1). Coimmunostaining with antibodies against PCNA and vWF showed that IPAH specimens contained 2 to 3 times more proliferating ECs in distal PAs (Figure 1A and Figures E1 and E2 in the online supplement). Double staining for TUNEL and vWF showed a 2-fold decrease in the number of apoptotic ECs in distal PAs compared with the control specimens (Figure 1B and Figures E1 and E3).

The balance between pro- and antiapoptotic factors determines the amount of apoptosis. Therefore, we conducted parallel immunohistochemical evaluations to investigate whether the expression of antiapoptotic family members was modified in distal PA endothelium from patients with IPAH. Consistent with the *in situ* incidence of EC apoptosis, we found strong BCL2 (Figure 1C) and BCL-xL (Figure 1D) staining within the endothelium of distal PAs from patients with IPAH as compared with a weak staining within the endothelium of control specimens.

P-ECs from Patients with IPAH Show Increased Proliferation and Diminished Sensitivity to Apoptosis Induction *In Vitro*

To determine whether the abnormal phenotype of P-ECs from patients with IPAH found *in situ* was maintained *in vitro*, primary P-EC cultures were generated from the lung specimens and used to evaluate the proliferation/cell death balance under basal conditions and after apoptosis induction by serum deprivation.

Under basal conditions (0.5% FCS), proliferation of IPAH P-ECs was increased by approximately 35% compared with control–P-ECs (Figure 2A). In addition, FCS increased P-EC proliferation in a dose-dependent manner, and this effect was even more pronounced with cells from patients with IPAH (Figures 2A and 2B). Furthermore, although cell proliferation decreased after 24 hours without serum, the difference between control P-ECs and IPAH P-ECs was maintained. We next extended these results using fluorescence-activated cell sorting (FACS) to analyze and compare the cell cycle between control and IPAH P-ECs. With 10% FCS, control versus IPAH P-ECs were distributed respectively as follows: subG0 phase, 13.8 ± 1.2% versus 6.8 ± 1.7%, $P < 0.05$; G0/G1 phase, 72.1 ± 1.5% versus 72.6 ± 4.4%, NS; and S+G2/M phase, 14.1 ± 1.1% versus 20.6 ± 1.9%, $P < 0.05$. Serum deprivation for 24 hours led to a marked increase in subG0-phase cells among control P-ECs but not IPAH P-ECs (Figure E4).

In parallel experiments, we used annexinV FITC/PI staining and flow cytometry analysis to look for differences in apoptosis between control and IPAH P-ECs with and without serum

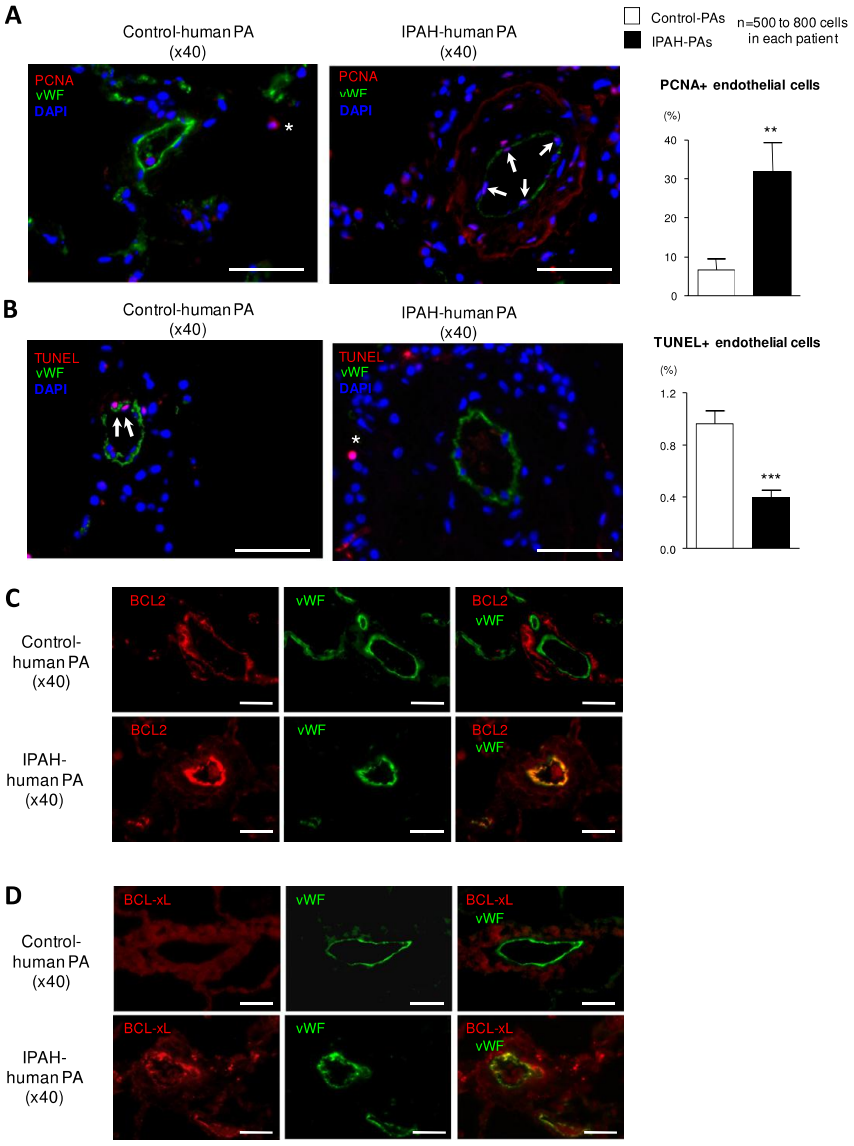


Figure 1. Representative photomicrographs of distal pulmonary arteries (PAs) in lung sections from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) and control subjects. Coimmunolocalization of (*A*) von Willebrand factor (vWF) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), (*B*) vWF and terminal deoxynucleotidyl transferase–mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL), (C) vWF and B-cell lymphoma (BCL)2, and (*D*) vWF and B-cell lymphoma–extra long (BCL-xL). The percentages of PCNA- and TUNEL-positive ECs were obtained from the analysis of 15 to 20 different distal pulmonary arteries selected randomly in each patient. *Arrows*: PCNA- or TUNEL-positive pulmonary endothelial cells (P-ECs). *PCNA- or TUNEL-positive cells. *Scale bar* = 50 μm. Values are mean ± SEM (n = 3–5). $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ compared with control PAs.

(Figure 2C). No significant difference in the percentage of apoptotic cells (annexinV^+/PI^-) was noted between control and IPAH P-ECs under basal conditions. After serum deprivation for 24 hours, we found a significant increase in the percentage of annexinV^+/PI^- cells among control P-ECs compared with IPAH P-ECs. After 48 hours of serum deprivation, annexinV^+/PI^- cells contributed greater than 50% of control P-ECs and greater than 25% of IPAH P-ECs.

We used other apoptosis-inducing stimuli to further explore the sensitivity of IPAH P-ECs to apoptosis compared with control–P-ECs (Figure 2D). Consistent with the results obtained after serum deprivation, we found that IPAH–P-ECs were less sensitive than control P-ECs to apoptosis induction by H_2O_2 or cycloheximide.

The Apoptosis Resistance and the Hyperproliferation of IPAH P-ECs Are Respectively Mediated by Increased Antiapoptotic BCL2 and BCL-xL Proteins and by a Constitutive Activation of ERK1/2

Subsequent studies were performed to investigate whether the expression of genes for pro- and antiapoptotic factors differed between control and IPAH–P-ECs. First, we measured mRNA levels of Bax, BCL2, and BCL-xL (Figure 3A). No significant

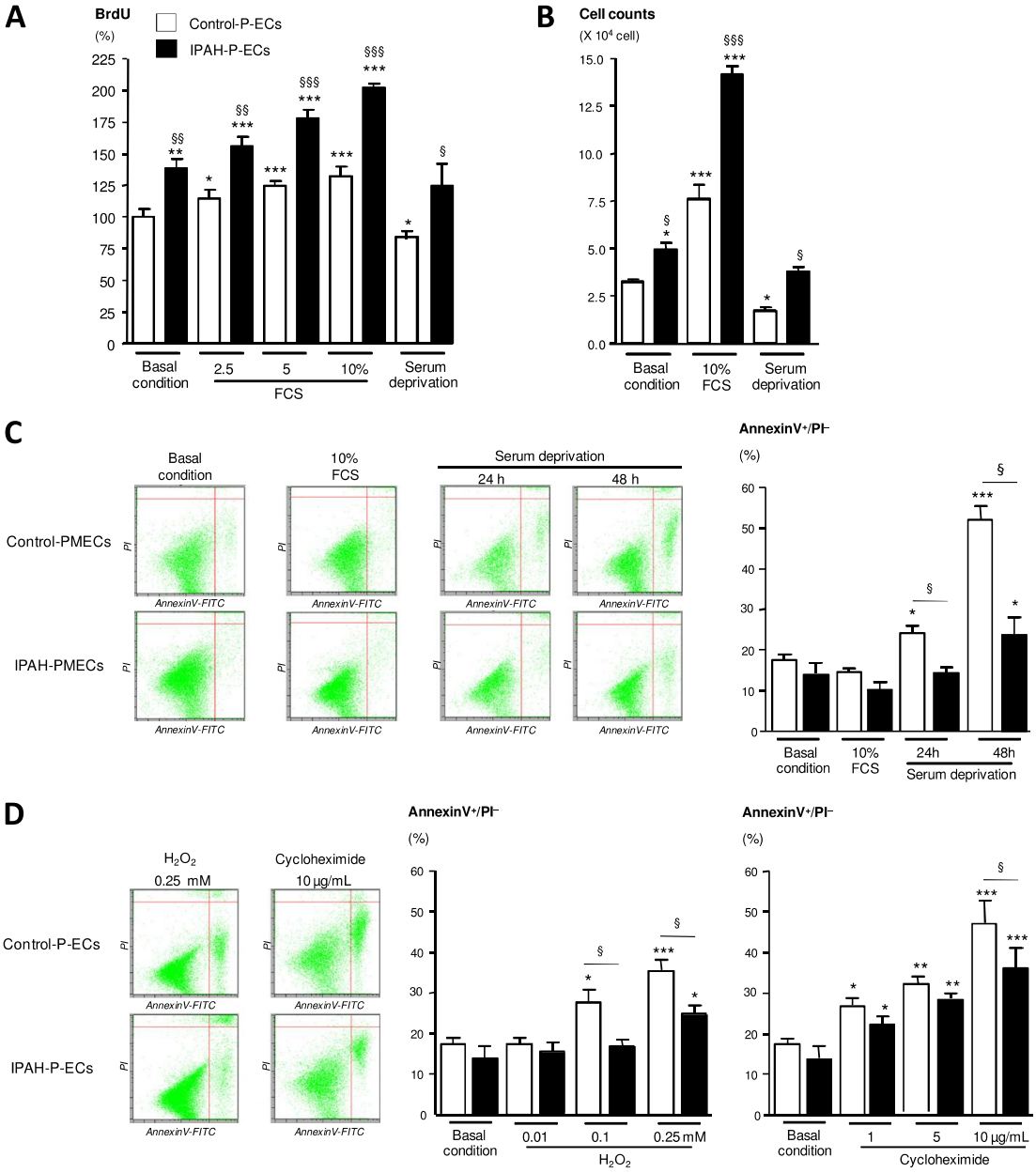


Figure 2. *In vitro* proliferation and apoptosis analysis of human P-ECs isolated from IPAH and control lung biopsies. Proliferation of control- and IPAH P-ECs was assessed by (*A*) 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation and (*B*) viable cell counts under basal conditions in the presence of FCS or after apoptosis induction by serum deprivation (24 h). (*C*) Representative two-color FACS analysis of the annexinV-FITC assays and quantification of the percentage of annexinV$^+$/PI$^-$ P-EC under basal conditions in the presence of FCS and after apoptosis induction by serum deprivation. (*D*) Evaluation of sensitivity to apoptosis induced by H_2O_2 and cycloheximide. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ compared with control P-ECs under basal conditions. $^{§}P < 0.05$, $^{§§}P < 0.01$, and $^{§§§}P < 0.001$ between control and IPAH P-ECs subjected to the same treatment.

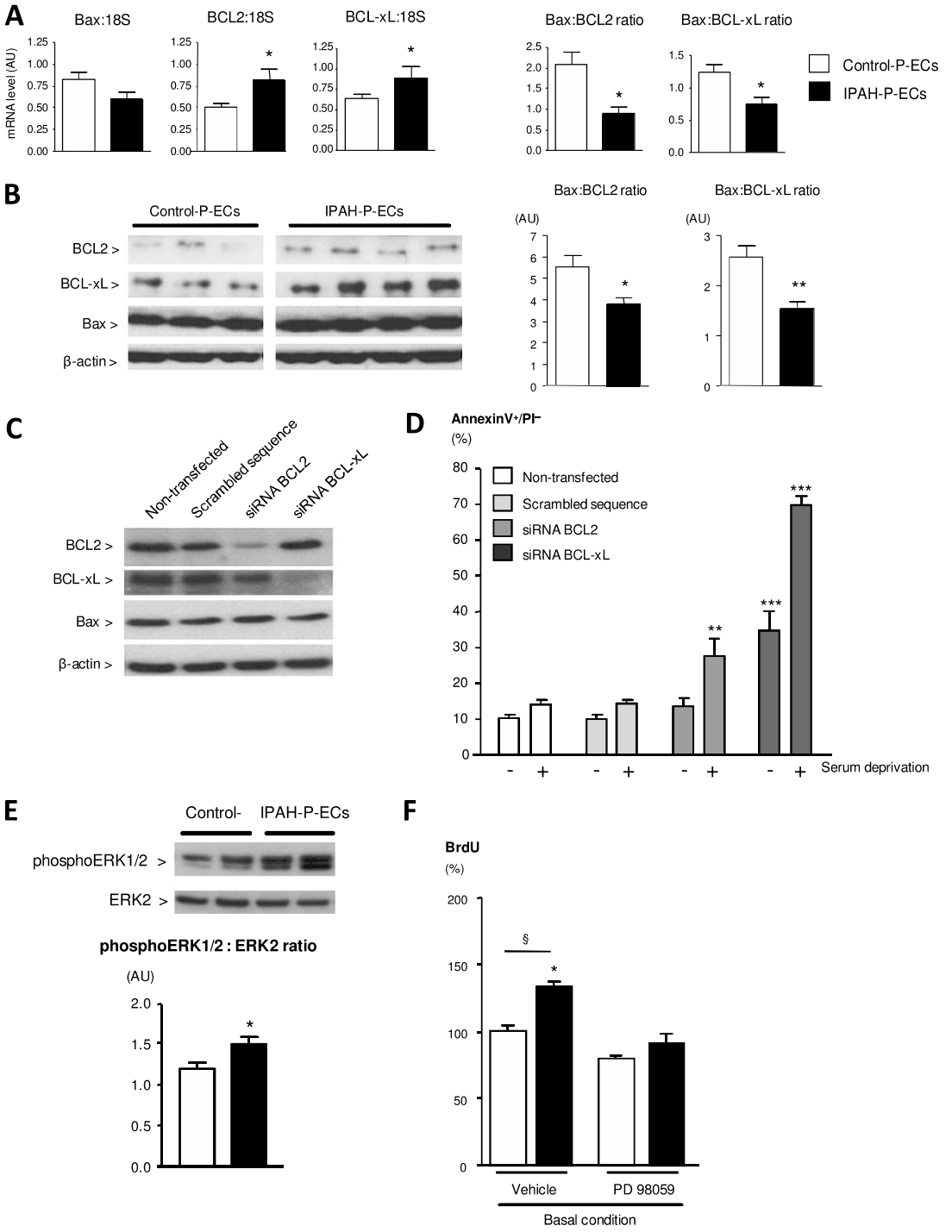

A
Bax:18S
BCL2:18S
BCL-xL:18S
mRNA level (AU)
Bax:BCL2 ratio
Bax:BCL-xL ratio
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
B
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
BCL2 >
BCL-xL >
Bax >
β-actin >
Bax:BCL2 ratio
Bax:BCL-xL ratio
(AU)
C
Non-transfected
Scrambled sequence
siRNA BCL2
siRNA BCL-xL
BCL2 >
BCL-xL >
Bax >
β-actin >
D
AnnexinV+/PI-
(%)
Non-transfected
Scrambled sequence
siRNA BCL2
siRNA BCL-xL
Serum deprivation
E
Control-
IPAH-P-ECs
phosphoERK1/2 >
ERK2 >
phosphoERK1/2 : ERK2 ratio
(AU)
F
BrdU
(%)
Vehicle
PD 98059
Basal condition

Figure 3. Evaluation of the expression of proapoptotic (Bax) and antiapoptotic (BCL2 and BCL-xL) factors and ERK1/2 phosphorylation status in cultured human control and IPAH P-ECs and role in the apoptosis resistance and the proliferative potential. (*A*) Relative levels of mRNAs encoding Bax, BCL2, and BCL-xL and values of the Bax:BCL2 and Bax:BCL-xL ratios. (*B*) Representative Western immunoblots of Bax, BCL2, BCL-xL, and β-actin loading control and quantification of the Bax:BCL2 and Bax:BCL-xL ratios. (*C*) Representative Western immunoblots of Bax, BCL2, BCL-xL, and β-actin loading control in IPAH P-ECs 72 hours after transfection with lipofectamine alone, scrambled sequence, BCL2 siRNA, or BCL-xL siRNA. (*D*) Quantification of the percentage of annexinV$^+$/PI$^-$ cells in the IPAH P-EC population with 10% FCS or after apoptosis induction by serum deprivation (24 h) 48 hours after transfection with BCL2 siRNA and/or BCL-xL siRNA or scrambled sequence. (*E*) Representative Western immunoblots of phosphoERK1/2 and ERK2 and quantification of the phosphoERK1/2:ERK2 ratio. (*F*) Proliferation of control and IPAH P-ECs assessed by BrdU incorporation under basal condition in presence of PD98059 or vehicle. Values are mean ± SEM (n = 5–10). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$ between control and IPAH P-ECs or compared with IPAH P-ECs transfected with the scrambled sequence. §$P < 0.05$ between control and IPAH P-ECs subjected to the same treatment.

differences were found in the mRNA expression of the proapoptotic factor Bax. In contrast, IPAH P-ECs had significantly higher levels of mRNA for antiapoptotic molecules BCL2 and BCL-xL as compared with control P-ECs. These results suggested an imbalance with an excess of antiapoptotic factors over proapoptotic factors in IPAH P-ECs compared with control P-ECs. Consistent with the gene expression results, no differences in Bax protein levels were found between the two groups (Figure 3B). However, BCL2 and BCL-xL proteins were significantly increased in IPAH P-ECs as compared with control P-ECs. Under basal conditions, IPAH P-ECs had an approximately 35% decrease in the Bax:BCL2 ratio and an approximately 40% decrease in the Bax:BCL-xL ratio compared with control P-ECs.

Next, we investigated whether decreasing BCL2 and BCL-xL levels in cultured human IPAH P-ECs by RNA interference restored sensitivity to apoptosis induction. Transfecting P-ECs with BCL2 siRNA and BCL-xL siRNA decreased the BCL2 protein level by about 87% and the BCL-xL protein level by about 80% compared with transfection with scrambled siRNA (Figure 3C). Compared with scrambled sequence, BCL2 siRNA or BCL-xL siRNA markedly increased the level of apoptosis induced by serum deprivation of IPAH P-ECs (Figure 3D). In the presence of serum, treatments of IPAH P-ECs with the scrambled sequence or BCL2 siRNA were associated with similar basal levels of apoptosis. In contrast, BCL-xL siRNA induced a 3-fold increase in the basal level of IPAH P-EC apoptosis (Figure 3D).

We next explored whether the hyperproliferative potential of IPAH P-ECs was due to changes in the basal ERK1/2 phosphorylation status. ERK1/2 are members of the MAPK superfamily known to be a potent regulator of cell growth that can be activated in response to a diverse range of extracellular stimuli, including mitogens, growth factors, and cytokines (20). First, we used Western blot analysis to assess the basal ERK1/2 phosphorylation status and found a constitutive activation of ERK1/2 in IPAH P-ECs as compared with control P-ECs (Figure 3E). Second, we showed that inhibition of ERK1/2 activation by the selective antagonist of MEK (MAPK/ERK kinase) PD98059 almost completely normalized the proliferation of IPAH P-ECs (Figure 3F). Taken together, these results strongly suggest that the constitutive activation of ERK1/2 and the hyperproliferative phenotype of IPAH P-ECs are connected.

FGF2 Expression and Responsiveness Are Dysregulated in IPAH P-ECs

Although many genes may contribute to the resistance to apoptosis, previous studies have demonstrated that FGF2 promotes resistance to apoptosis in NIH-3T3 cells, chronic lymphocytic leukemia B-cell lines, and bovine aortic ECs (11–14). Inappropriate expression of FGF2 and its receptors causes aberrant cell proliferation in many cancers (21). Furthermore, we recently reported that endothelial FGF2 was overproduced by IPAH P-ECs as compared with control P-ECs *in vitro* and *in vivo* (9). Thus, to investigate whether FGF2 signaling was enhanced in the IPAH P-ECs not only via increased FGF2 expression but also due to alterations in FGF2 receptors expression, we measured the mRNA levels of FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, and FGF-R4 (Figure 4A). No differences in mRNA levels of FGF-R1, FGF-R3, or FGF-R4 were found. In contrast, the mRNA (Figure 4A) and protein (Figure 4B) expression of FGF-R2 was substantially increased in IPAH P-ECs compared with control P-ECs. Consistent with our previous findings (9), we also found that FGF2 was markedly overproduced in IPAH P-ECs as compared with control P-ECs at the mRNA (Figure 4A) and protein levels (13.3 ± 2.7 versus 2.6 ± 0.9 pg/ml in conditioned media by ELISA, respectively; $P < 0.001$).

We then investigated the responsiveness of control and IPAH P-ECs to conditioned media from either cell population under serum deprivation (Figure 4C). Compared with control P-EC media, IPAH P-EC media induced greater proliferation of cultured control P-ECs. The proliferation induced by the two media was even more pronounced when cultured IPAH P-ECs were used. In parallel experiments, we used annexinV FITC/PI staining and flow cytometry analysis to evaluate potential protective effects of conditioned control and IPAH P-EC media on serum deprivation–induced apoptosis of control and IPAH P-ECs. The level of induced apoptosis of cultured control P-ECs was lower with IPAH P-EC media than with control P-EC media. No significant changes in the percentage of annexinV$^+$/PI$^-$ cells were observed with the use of IPAH P-ECs.

We then evaluated the responsiveness of control and IPAH P-ECs to rHu-FGF2 under serum deprivation (Figure 4D). The proliferation and survival of control P-ECs were increased dose-dependently by rHu-FGF2, and this effect was even more pronounced on IPAH P-ECs. Treatment with rHu-FGF2 in a dose of 0.1 ng/ml offered significant protection from serum deprivation–induced apoptosis.

FGF2 Increases Antiapoptotic BCL2, and BCL-xL Proteins and Leads to ERK1/2 Phosphorylation and Activation in Human P-ECs

Previous studies demonstrated that FGF2 promotes resistance to apoptosis in many types of differentiated cells and that this effect correlated with increased expression of BCL2 and BCL-xL (11–14). Based upon our immunohistochemical findings and our gene expression results showing marked increases in BCL2 and BCL-xL levels in IPAH P-ECs, we hypothesized that the antiapoptotic properties of FGF2 in P-ECs were mediated chiefly by up-regulation of these antiapoptotic proteins. To test this hypothesis, we first evaluated whether FGF2 modulated their expression in our primary cultures. Using control P-ECs treated with increasing rHu-FGF2 doses in the absence of serum, we found no changes in mRNA levels of Bax protein levels compared with control P-ECs treated with vehicle. In

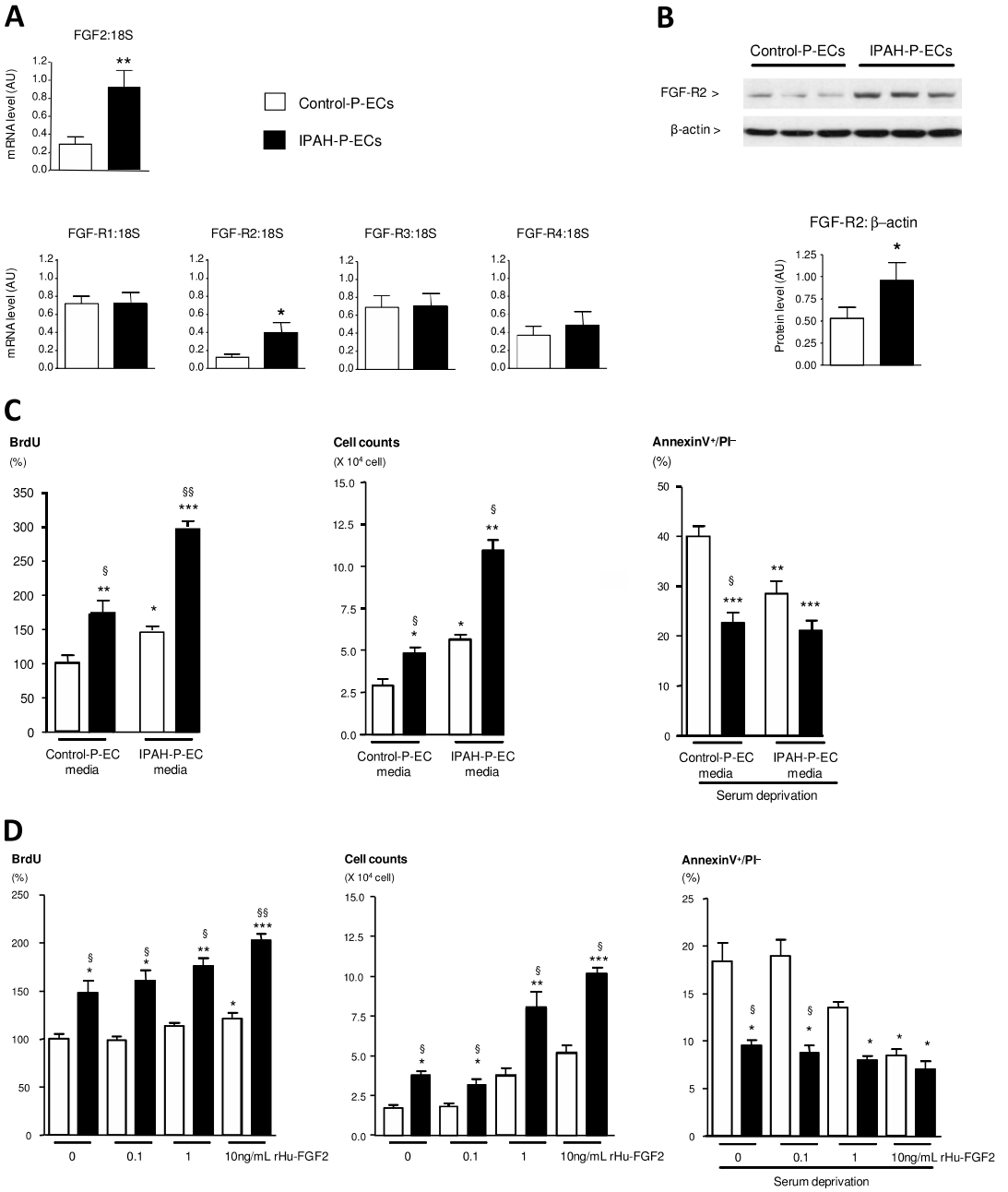


Figure 4. Analysis of mRNA levels of fibroblast growth factor (FGF)2 and its receptors in cultured human control and IPAH P-ECs and evaluation of their responsiveness to FGF2 under serum deprivation. (*A*) Relative levels of mRNAs encoding FGF2 and FGF-Rs in control and IPAH P-ECs. (*B*) Representative Western immunoblots of FGF-R2 and β-actin loading control and quantification of the FGF-R2:β-actin ratio. (*C*) Evaluation of the balance between proliferation/apoptosis of quiescent control and IPAH P-ECs under serum deprivation with or without conditioned media from IPAH or control P-ECs (*D*) or rHu-FGF2. *Bars* represent mean ± SEM ($n = 4$–8). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$ compared with control P-ECs. $^{\S}P < 0.05$ and $^{\S\S}P < 0.01$ between control and IPAH P-ECs subjected to the same treatment.

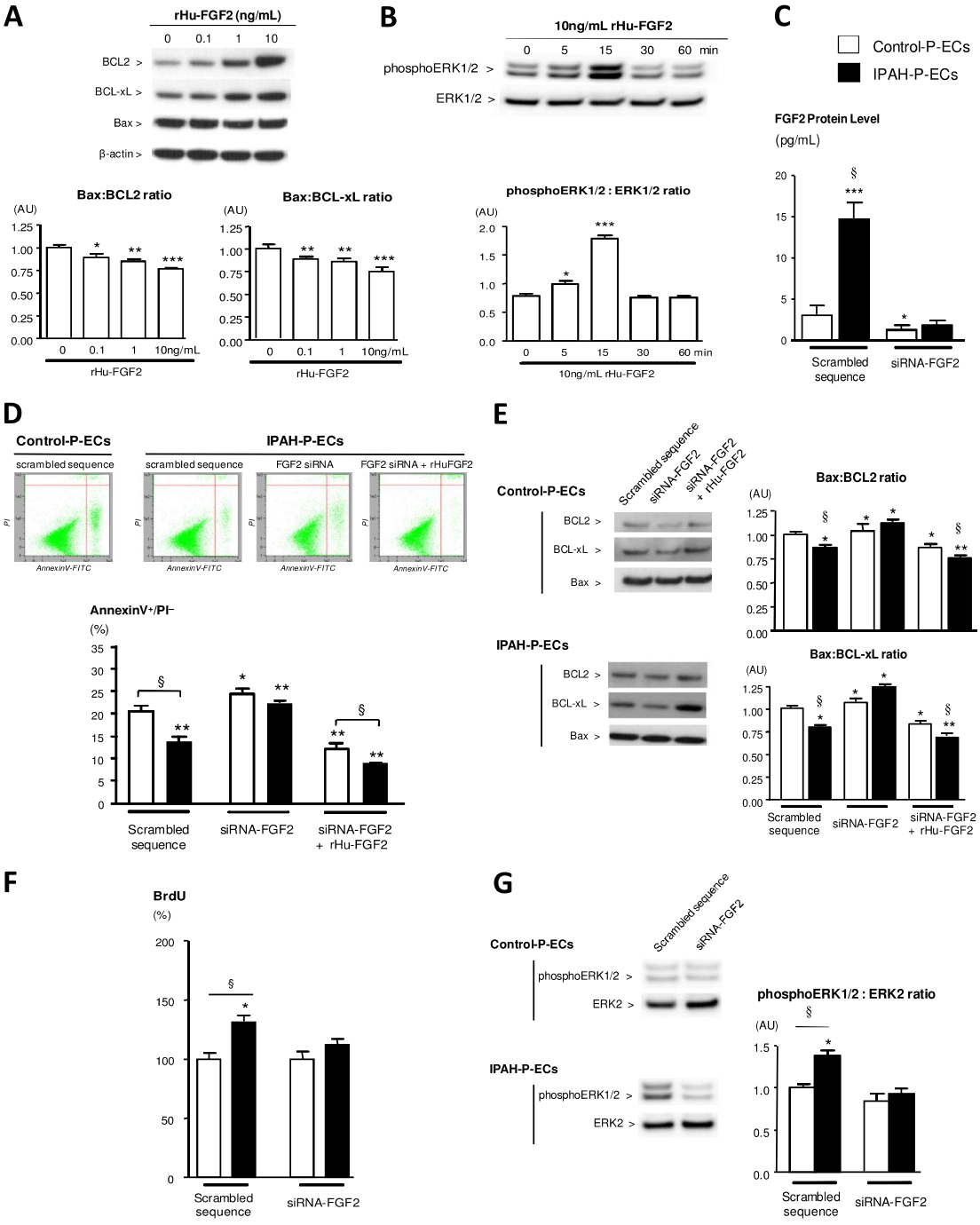

A
rHu-FGF2 (ng/mL)
0 0.1 1 10
BCL2 >
BCL-xL >
Bax >
β-actin >
Bax:BCL2 ratio
(AU)
rHu-FGF2
Bax:BCL-xL ratio
(AU)
rHu-FGF2
B
10ng/mL rHu-FGF2
0 5 15 30 60 min
phosphoERK1/2 >
ERK1/2 >
phosphoERK1/2 : ERK1/2 ratio
(AU)
10ng/mL rHu-FGF2
C
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
FGF2 Protein Level
(pg/mL)
Scrambled sequence
siRNA-FGF2
D
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
scrambled sequence
FGF2 siRNA
FGF2 siRNA + rHuFGF2
PI
AnnexinV-FITC
AnnexinV+/PI−
(%)
Scrambled sequence
siRNA-FGF2
siRNA-FGF2 + rHu-FGF2
E
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
Scrambled sequence
siRNA-FGF2
siRNA-FGF2 + rHu-FGF2
BCL2 >
BCL-xL >
Bax >
Bax:BCL2 ratio
(AU)
Bax:BCL-xL ratio
(AU)
F
BrdU
(%)
Scrambled sequence
siRNA-FGF2
G
Control-P-ECs
IPAH-P-ECs
Scrambled sequence
siRNA-FGF2
phosphoERK1/2 >
ERK2 >
phosphoERK1/2 : ERK2 ratio
(AU)

Figure 5. Effect of FGF2 on the expression of Bax, BCL2, or BCL-xL on the ERK1/2 phosphorylation status and its autocrine contribution to protection against serum-deprivation–induced apoptosis and to the excessive proliferation. (*A*) Representative Western immunoblots of Bax, BCL2, BCL-xL, and β-actin loading control and quantification of the Bax:BCL2 and Bax:BCL-xL ratios. (*B*) Representative Western immunoblots of phosphoERK1/2 and ERK2 and quantification of the phosphoERK1/2:ERK2 ratio. (*C*) FGF2 protein levels in conditioned media from control and IPAH P-ECs with or without FGF2 siRNA or scrambled sequence. (*D*) Representative two-color FACS analysis of the annexinV-FITC assays and quantification of the percentage of annexinV^+/PI^- cells in control P-EC and IPAH P-EC populations after apoptosis induction by serum deprivation (24 h) 48 hours after transfection with FGF2 siRNA or scrambled sequence with or without rHu-FGF2 (10 ng/ml). (*E*) Representative Western immunoblots of Bax, BCL2, and BCL-xL and quantification of the Bax:BCL2 and Bax:BCL-xL ratios. (*F*) Proliferation of control and IPAH P-ECs 48 hours after transfection with FGF2 siRNA or scrambled sequence assessed by BrdU incorporation. (*G*) Representative Western immunoblots of phosphoERK1/2 and ERK2 and quantification of the phosphoERK1/2:ERK2 ratio. Values are mean ± SEM (n = 3–7). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$ compared with 0 ng/ml of rHu-FGF2 or with control P-ECs transfected with the scrambled sequence. §$P < 0.05$ between control and IPAH P-ECs subjected to the same treatment.

contrast, BCL2 and BCL-xL protein levels increased dose dependently in response to rHu-FGF2 compared with control P-ECs treated with vehicle (Figure 5A). We found that 10 ng/ml of rHu-FGF2 significantly decreased the Bax/BCL2 and Bax/BCL-xL ratios by approximately 30%.

We then assessed and confirmed that FGF2 signaling is a potent modulator of ERK phosphorylation and activation in P-ECs by showing that rHu-FGF2 application (10 ng/ml) led to a time-dependent increase in ERK1/2 phosphorylation (Figure 5B).

Inhibition of FGF2 in IPAH P-ECs Restores Sensitivity to Apoptosis Induced by Serum Deprivation and Normalizes the Excessive Proliferation

We next investigated the contribution of autocrine FGF2 to protection against serum deprivation–induced apoptosis of human IPAH P-ECs. We determined if decreasing FGF2 by RNA interference would restore sensitivity to apoptosis induction. We first measured soluble FGF2 levels in conditioned media by ELISA and found that FGF2 siRNA decreased FGF2 protein levels in control P-ECs and IPAH P-ECs (Figure 5C). In IPAH P-ECs, FGF2 siRNA decreased the FGF2 protein level by 78% as compared with the scrambled sequence. Consistent with our previous findings, after transfection with scrambled siRNA, the percentage of annexinV^+/PI^- cells was significantly lower among IPAH P-ECs than among control P-ECs after 24 hours of serum deprivation (Figure 5D). In contrast, IPAH P-ECs transfected with FGF2 siRNA contained a substantially higher proportion of annexinV^+/PI^- cells compared with IPAH P-ECs transfected with the scrambled sequence at the same time point (Figure 5D). Furthermore, the percentage of annexinV^+/PI^- cells was similar among IPAH P-ECs transfected with FGF2 siRNA and control P-ECs transfected with the scrambled sequence. In addition, the apoptosis resistance of IPAH P-ECs transfected with FGF2 siRNA was restored in the presence of rHu-FGF2, compared with IPAH P-ECs transfected with FGF2 siRNA alone (Figure 5D). Consistent with our hypothesis, we found that this restoration of sensitivity to apoptosis in IPAH P-ECs was related to decreased expression of BCL2 and BCL-xL proteins (Figure 5E).

In many cancers, an autocrine FGF activation loop controls ERK1/2 activation (21). Therefore, we investigated whether excessive autocrine release of endothelial-derived FGF2 explained the constitutive ERK1/2 activation and thus the hyperproliferative phenotype of IPAH P-ECs. To test this theory, we used BrdU and Western blot analysis to assess the effect of FGF2 depletion on EC proliferation and ERK1/2 phosphorylation status. Under basal conditions, FGF2 depletion in IPAH P-ECs by RNA interference almost completely abolished the excessive proliferation and the constitutive ERK1/2 activation in IPAH P-ECs compared with IPAH P-ECs transfected with the scrambled sequence (Figures 5F and 5G). Collectively, these results strongly suggest that excessive autocrine release of endothelial-derived FGF2 may contribute to the hyperproliferative phenotype through constitutive activation of ERK1/2.

DISCUSSION

We report evidence that autocrine FGF2 signaling is critical for the acquisition and maintenance of a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype in pulmonary ECs in IPAH. Muscularized walls of distal PAs from IPAH lung specimens contained large numbers of proliferating ECs (a 2- to 3-fold increase) and small numbers of apoptotic ECs (a 2-fold decrease), as well as increased immunoreactivity for BCL2 and BCL-xL, compared with control lung specimens. These *in situ* findings were replicated *in vitro*: Cultured human IPAH P-ECs exhibited a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype compared with control P-ECs. With three different apoptosis-inducing stimuli, IPAH P-ECs were less sensitive to apoptosis induction compared with control P-ECs. We then showed that this apoptosis-resistant phenotype of IPAH P-ECs was mediated by an excess of antiapoptotic factors over proapoptotic factors, with increased expression of BCL2 and BCL-xL mRNA and proteins as compared with control cells. In addition, we obtained evidence that the hyperproliferative phenotype of IPAH P-ECs was associated with constitutive activation of ERK1/2. Finally, we demonstrated that this abnormal phenotype resulted from an autocrine loop of EC-derived FGF2 in IPAH P-ECs. These findings provide further evidence of the multifunctional role for FGF2 signaling in the pathophysiology of IPAH and support the notion that FGF2 may be a promising new treatment target in the disease.

Previous *in vitro* and animal studies have suggested that the balance between EC proliferation/apoptosis is disturbed in IPAH, but the exact nature of these defects remains to be elucidated (10). Our *in situ* immunohistochemical studies of the distal PA endothelium from patients with IPAH showed a 2- to 3-fold increase in proliferating ECs and a 2-fold decrease in apoptotic ECs, as compared with control subjects. Thus, abnormal regulation of the balance between proliferation and apoptosis appears to be present even in the late stages of the disease. Although this balance is vital for vascular wall homeostasis and remodeling, the mechanisms that coordinate apoptosis and proliferation remain incompletely understood. We found strong BCL2 and BCL-xL staining in the distal PA endothelium of patients with IPAH as compared with control subjects, suggesting that the decrease in apoptotic ECs reflects an excess of antiapoptotic factors over proapoptotic factors. The abnormalities found *in situ* persisted *in vitro*. First, cultured IPAH P-ECs exhibited a hyperproliferative phenotype and diminished sensitivity to apoptosis induction compared with control P-ECs. Consistent with our results obtained in P-ECs, Masri and

colleagues reported that pulmonary artery ECs from patients with IPAH exhibited an unusual hyperproliferative potential, with decreased susceptibility to apoptosis (22). Second, we found similar Bax mRNA and protein levels but markedly increased BCL2 and BCL-xL mRNA and protein levels in cultured IPAH P-ECs compared with control P-ECs. Our results demonstrate that an excess of antiapoptotic factors over proapoptotic factors likely accounts for the decreased sensitivity to apoptosis induction observed in the IPAH P-ECs *in vitro*. Indeed, IPAH P-EC treatment with BCL2 siRNA caused a 3-fold increase in sensitivity to apoptosis compared with IPAH P-EC treatment with the scrambled sequence. IPAH P-EC treatment with BCL2 siRNA did not affect the basal apoptotic level in the presence of serum. However, P-EC treatment with BCL-xL siRNA markedly increased not only IPAH P-EC sensitivity to apoptosis but also the basal apoptotic level in the presence of serum. These findings are consistent with a recent report by Ackermann and colleagues showing that, in human umbilical vein ECs, inhibition of endogenous BCL-xL production by antisense oligonucleotides caused 10 to 25% of the cell population to undergo apoptosis under basal conditions (23). One possible explanation is that BCL-xL, but not BCL2, plays a primary role in basal EC viability. Alternatively, qualitative and quantitative differences in the functional activity of these two antiapoptotic proteins may explain these differences. Fiebig and colleagues recently reported that BCL-xL was qualitatively different from and 10 times more effective than BCL2 under the same conditions (24). It has also been reported that BCL2 and BCL-xL can differentially block chemotherapy-induced cell death, with BCL-xL showing a stronger protective effect than BCL2 against cell death induced by several chemotherapeutic agents (25). In addition, we obtained evidence that constitutive activation of ERK signaling in IPAH P-ECs contributes to the hyperproliferative phenotype. Taken together, our results constitute strong evidence that the abnormal hyperproliferative apoptosis-resistant IPAH P-EC phenotype is ascribable to an intrinsic abnormality present in these cells. Because the tissue sections and cells we obtained were from patients with end-stage disease receiving drug therapy, we cannot exclude the possibility that these abnormalities represent a compensatory mechanism and do not participate in early-stage vascular remodeling in IPAH. However, several recent reports suggest that proapoptotic treatments used in cancer (including dichloroacetate, imatinib, and antisurvivin agents) may reverse pulmonary vascular remodeling and PAH (26–28). Despite the importance of EC apoptosis, the precise molecular mechanism underlying the regulation of apoptotic pathways remains largely undetermined.

Although apoptosis is a multistage, genetically controlled process that allows normal cell turnover, it is subject to physiologic and pathophysiologic regulation (29) mediated in part by dependence upon growth factors and cytokines (30–33). We recently reported that FGF2 was overproduced by IPAH P-ECs and contributed to SMC hyperplasia and to IPAH progression in humans and rodents (9). FGF2 is a multifunctional cytokine involved in many biological processes, including cell proliferation, differentiation, migration, neoangiogenesis, and cell survival. Recent work has shown that FGFs, including FGF2, can promote resistance to chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo* (34). This is of interest not only because FGF2 is overproduced in patients with IPAH but also because the extracellular matrix (ECM) acts as a physiological reservoir for secreted FGF2, and various enzymes (including metalloproteinases, plasmin, and urokinase-type plasminogen) are capable of releasing ECM-bound FGF2. This delicate balance between FGF2 storage and release in the ECM probably modulates the biological effects of FGF2 on the endothelium. P-EC treatment with FGF2 siRNA almost completely restored sensitivity to apoptosis induced by serum deprivation, whereas no change was observed with the scrambled sequence. This phenomenon was strongly related to decreased expression of BCL2 and BCL-xL proteins and was abolished in the presence of rHu-FGF2. In addition, under basal conditions, FGF2 depletion by RNA interference almost completely abolished the excessive proliferation and the constitutive ERK1/2 activation in IPAH P-ECs compared with IPAH P-ECs transfected with the scrambled sequence. Collectively, these findings indicate that increased activity of the FGF2 autocrine loop is among the mechanisms needed to acquire not only the *in vitro* P-EC apoptosis-resistant phenotype but also the *in vitro* P-EC hyperproliferative phenotype.

We previously reported that the conditioned media from IPAH P-ECs did not contain greater amounts of PDGF, EGF, and TGF-β as compared with control P-EC media, suggesting that these growth factors were not involved in the acquisition and maintenance of the hyperproliferative apoptosis-resistant phenotype (9). In contrast, the amount of FGF2 secreted into the media by IPAH P-ECs was five times greater than the amount released by control P-ECs. We cannot exclude the involvement of other growth factors, such as insulin growth factor-1 (35), vascular endothelial growth factor (36, 37), or bone morphogenetic proteins (38), to support EC growth and prevent EC apoptosis. However, multiple lines of evidence suggest that FGF2 contributes significantly to the acquisition and maintenance of the abnormal P-EC phenotype. First, FGF2 binding to the ECM leads to underestimation of the amount of FGF2 released by IPAH P-ECs and also concentrates active FGF2 within the ECM in close proximity to the P-ECs. Second, FGF2 knockdown in IPAH P-ECs returns not only the sensitivity to apoptosis but also the proliferative potential to a level close to that of control P-ECs. Herein, we obtained evidence for altered responsiveness to rHu-FGF2 and to conditioned media in IPAH P-ECs when compared with control P-ECs, suggesting that dysregulation of the FGF2 signaling pathway was associated not only with FGF2 overproduction but also with altered expression of FGF receptors. Consistent with our hypothesis, we found increased FGF-R2 expression in IPAH P-ECs as compared with control P-ECs. Matsunaga and colleagues (39) recently demonstrated that overexpression of a constitutively active FGF-R2 in ECs *in vitro* enhanced migration and survival and augmented autocrine FGF2 production. Therefore, increased FGF-R2 protein/activity in IPAH P-ECs may contribute to the excessive FGF2 secreted by these cells. Deficient activity of PPARγ may also explain the augmented FGF2 production by IPAH P-ECs. Loss of PPARγ is associated with the development of PAH (8, 40) and the modulation of a number of endothelial genes, including up-regulation (41) of FGF2. It is also possible that ECs overexpressing FGF2 are selected early in the pathogenesis of IPAH (10), thus contributing to the expansion of a hyperproliferative apoptosis-resistant population.

FGF-R2, similar to the other FGF-Rs, is a specific split tyrosine kinase receptor coupled to multiple intracellular signaling pathways, including the MAPK pathway, the phospholipase-C/protein kinase-C pathway, and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and Src-associated pathways (15). Tyrosine kinase receptor activation by growth factors enhances cell survival through several mechanisms, including regulation of the BCL2 family proteins (30–33). However, the molecular mechanisms by which FGF2 promotes resistance to apoptosis in human P-ECs are incompletely understood. Here, we showed that (*1*) FGF2 treatment led to rapid and marked increases in BCL2 and BCL-xL and to ERK1/2 phosphorylation and activation in primary cultures of human P-ECs and (*2*) inhibition of the autocrine FGF2 production in IPAH P-ECs restores sensitivity to apoptosis

induced by serum deprivation and normalizes the excessive proliferation under basal condition.

In summary, this study underscores a novel mechanism by which endothelial FGF2 overproduction contributes in an autocrine manner not only to the apoptosis-resistant phenotype but also to the hyperproliferative phenotype of P-ECs, both of which are characteristic of IPAH. The apoptosis-resistant phenotype was directly mediated by an imbalance of proapoptotic over antiapoptotic factors. We obtained evidence that the constitutive activation of ERK1/2 contributes to the hyperproliferative phenotype of IPAH P-ECs. We show that FGF2 modulates not only the expression of some of these antiapoptotic factors in human P-ECs, including BCL2 and BCL-xL, but also ERK phosphorylation and activation in human P-ECs. Collectively, our data support the notion that the overproduction of EC-derived FGF2 in IPAH contributes to multiple different components of the disease, including SMC hyperplasia via a paracrine effect and the acquisition and maintenance of a hyperproliferative apoptosis-resistant phenotype via an autocrine loop. Taken together with data demonstrating a beneficial effect in several malignant disorders and from our previous study in an animal model of PAH, these results suggest that the FGF2 signaling pathway may represent an attractive therapeutic target in PAH.

Author Disclosure: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

References

1. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2009;34:1219–1263.
2. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S43–S54.
3. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S10–S19.
4. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:13S–24S.
5. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, *et al.* Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S20–S31.
6. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, Humbert M, Maitre B, Barlier-Mur AM, Simonneau G, Hamon M, Naeije R, Eddahibi S. Angiopoietin/tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1025–1033.
7. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Dartevelle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006;113:1857–1864.
8. Guignabert C, Alvira CM, Alastalo TP, Sawada H, Hansmann G, Zhao M, Wang L, El-Bizri N, Rabinovitch M. Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes pdgf receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1082–L1090.
9. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Dartevelle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, *et al.* Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009;119:512–523.
10. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res* 2009;10:95.
11. Fuks Z, Persaud RS, Alfieri A, McLoughlin M, Ehleiter D, Schwartz JL, Seddon AP, Cordon-Cardo C, Haimovitz-Friedman A. Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994;54:2582–2590.
12. Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M, Ehleiter D, Michaeli J, Vlodavsky I, Fuks Z. Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:2591–2597.
13. Konig A, Menzel T, Lynen S, Wrazel L, Rosen A, Al-Katib A, Raveche E, Gabrilove JL. Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of Bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis. *Leukemia* 1997;11:258–265.
14. Wieder R, Wang H, Shirke S, Wang Q, Menzel T, Feirt N, Jakubowski AA, Gabrilove JL. Low level expression of basic FGF upregulates Bcl-2 and delays apoptosis, but high intracellular levels are required to induce transformation in NIH 3T3 cells. *Growth Factors* 1997;15:41–60.
15. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116–129.
16. Miao HQ, Fritz TA, Esko JD, Zimmermann J, Yayon A, Vlodavsky I. Heparan sulfate primed on beta-d-xylosides restores binding of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biochem* 1995;57:173–184.
17. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein–basic fibroblast growth factor–is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988;130:393–400.
18. Guignabert C, Tu L, Izikki M, Dewachter L, Zadigue P, Humbert M, Adnot S, Fadel E, Eddahibi S. Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *FASEB J* 2009;23:4135–4147.
19. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005;111:2812–2819.
20. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12:9–18.
21. Lefevre G, Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mrzyk S, Mascarelli F. Activation of the FGF2/FGFr1 autocrine loop for cell proliferation and survival in uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1047–1057.
22. Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, Drazba J, Anand-Apte B, Erzurum SC. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L548–L554.
23. Ackermann EJ, Taylor JK, Narayana R, Bennett CF. The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1999;274:11245–11252.
24. Fiebig AA, Zhu W, Hollerbach C, Leber B, Andrews DW. Bcl-XL is qualitatively different from and ten times more effective than Bcl-2 when expressed in a breast cancer cell line. *BMC Cancer* 2006;6:213.
25. Simonian PL, Grillot DA, Nunez G. Bcl-2 and Bcl-XL can differentially block chemotherapy-induced cell death. *Blood* 1997;90:1208–1216.
26. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005;115:1479–1491.
27. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004;95:830–840.
28. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–2821.
29. Letai A, Scorrano L. Laying the foundations of programmed cell death. *Cell Death Differ* 2006;13:1245–1247.
30. Bryckaert M, Guillonneau X, Hecquet C, Courtois Y, Mascarelli F. Both FGF1 and Bcl-X synthesis are necessary for the reduction of apoptosis in retinal pigmented epithelial cells by FGF2: role of the extracellular signal-regulated kinase 2. *Oncogene* 1999;18:7584–7593.
31. Jost M, Huggett TM, Kari C, Boise LH, Rodeck U. Epidermal growth factor receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-XL expression through a mek-dependent pathway. *J Biol Chem* 2001;276:6320–6326.

32. Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS. Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the P42/P44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2086–2090.
33. Pugazhenthi S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. Insulin-like growth factor-i induces Bcl-2 promoter through the transcription factor camp-response element-binding protein. *J Biol Chem* 1999;274:27529–27535.
34. Song S, Wientjes MG, Gan Y, Au JL. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8658–8663.
35. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor i receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143–163.
36. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3′-kinase/Akt signal transduction pathway: requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336–30343.
37. Voelkel NF, Cool C, Taraceviene-Stewart L, Geraci MW, Yeager M, Bull T, Kasper M, Tuder RM. Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2002;30:S251–S256.
38. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 2006;98:209–217.
39. Matsunaga S, Okigaki M, Takeda M, Matsui A, Honsho S, Katsume A, Kishita E, Che J, Kurihara T, Adachi Y, *et al.* Endothelium-targeted overexpression of constitutively active FGF receptor induces cardioprotection in mice myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:663–673.
40. Hansmann G, de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Alvira CM, Guignabert C, Bekker JM, Schellong S, Urashima T, Wang L, Morrell NW, *et al.* An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2008;118:1846–1857.
41. Tian J, Smith A, Nechtman J, Podolsky R, Aggarwal S, Snead C, Kumar S, Elgaish M, Oishi P, Goerlach A, *et al.* Effect of ppargamma inhibition on pulmonary endothelial cell gene expression: gene profiling in pulmonary hypertension. *Physiol Genomics* 2009;40:48–60.

A Critical Role for p130^{Cas} in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents

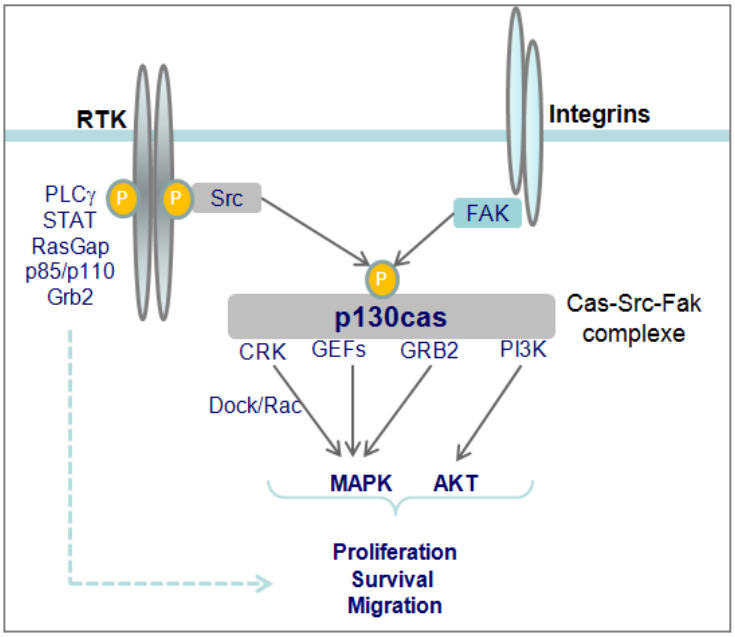
AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CRITICAL CARE MEDECINE

-Accepté-

Ly Tu, Frances S. De Man, Barbara Girerd, Marie-Camille Chaumais, Florence Lecerf, Charlène François, Frédéric Perros, Peter Dorfmüller, Elie Fadel, David Montani, Saadia Eddahibi, Marc Humbert and Christophe Guignabert

Introduction

Ces dernières années, un intérêt grandissant est porté aux facteurs de croissance et à leur voie de signalisation. Parmi ces facteurs, nous retrouvons le PDGF, l'EGF et le FGF2 qui ont été montrés comme centraux dans la physiopathologie de l'HP. Leur inhibition permet une prévention et/ ou une régression de la maladie dans les modèles animaux. Cependant les outils pharmacologiques spécifiques disponibles actuellement : les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), ne sont pas très sélectifs et touchent très souvent un très grand nombre d'autres cibles, et s'avèrent parfois délétères. p130^{cas} est une protéine adaptatrice qui intègre et amplifie la signalisation intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance et aux intégrines, facilitant ainsi l'induction de la prolifération, migration et survie cellulaire.



Représentation schématique du rôle joué par la voie p130^{cas}

Hypothèse

Par conséquent, nous avons testé si le facteur p130^{cas} était surexprimé dans l'HTAP et si cette anomalie contribuait à la réponse exagérée des cellules vasculaires pulmonaires aux différents facteurs de croissance.

Principaux résultats et Discussion

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord évalué les niveaux d'expression de p130^{cas} dans les tissus et cellules vasculaires humaines. Une nette surabondance de p130^{cas} a pu être mise en évidence dans les parois des artères pulmonaires remodelées de patients HTAPi par rapport aux patients contrôles. Comme cette surexpression prédomine au niveau du muscle lisse et de l'endothélium, nous avons ensuite déterminé son expression dans des CML-AP et CE pulmonaires contrôles versus HTAPi isolées en culture primaire. Nous avons pu ainsi montré que cette anomalie persiste bien *in vitro* : augmentation d'expression de la forme totale p130^{cas} et de la forme phosphrylée de p130^{cas} (forme active). A la suite de ces observations, nous avons déterminé l'importance de cette surexpression dans CE et CML HTAPi dans : 1) le potentiel prolifératif, 2) le potentiel migratoire, 3) l'amplification des réponses cellulaires aux facteurs de croissance PDGF, EGF et FGF2. Nos résultats montrent clairement que p130^{cas} est non seulement important pour la prolifération et la migration des CML et CE HTAP mais aussi pour la prolifération et la migration induites par ces différents facteurs. De manière importante, nous avons pu mettre en évidence que la déficience en p130^{cas} n'empêchait pas totalement la signalisation en réponse au PDGF, à l'EGF et au FGF2, mais qu'elle permettait seulement son amplification. Ainsi, nous pensons fortement que p130^{cas} représente une cible potentielle interressante pour limiter la prolifération et la migration dans la paroi des artères pulmonaires HTAP.

Conclusions

Dans ce travail, nous avons pu clairement montrer le rôle central de p130^{cas} dans la physiopathologie de l'HTAP. En intégrant et en facilitant la transmission du signal des récepteurs tyrosine kinase, p130^{cas} participe activement à la réponse anormalement éxagérée aux facteurs et donc à la progression du remodelage artériel pulmonaire. Etant donné qu'aucun outil pharmacologique n'est disponible à ce jour, cette étude devrait stimuler la création de telles molécules.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine/AJRCCM

A Critical Role for p130Cas in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents

Journal:	*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	OC - Original Contribution
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tu, Ly; INSERM U999, Cardiovascular Research Department De Man, Frances; VU University Medical Center, Pulmonology Girerd, Barbara; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Chaumais, Marie-Camille; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Lecerf, Florence; INSERM U999, Cardiovascular Research Department François, Charlène; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Perros, Frédéric; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Dorfmüller, Peter; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Fadel, Elie; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Montani, David; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Eddahibi, Saadia; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Humbert, Marc; INSERM U999, Cardiovascular Research Department Guignabert, Christophe; INSERM U999, Cardiovascular Research Department
Keywords:	Pulmonary arterial hypertension , Pulmonary vascular remodeling , Growth factors, Signal transduction, BCAR1

SCHOLARONE™

A Critical Role for p130^{Cas} in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents

Ly Tu[1,2], Frances S. De Man[1,2,3], Barbara Girerd[1,2,4], Marie-Camille Chaumais[1,2], Florence Lecerf[1,2], Charlène François[1,2], Frédéric Perros[1,2], Peter Dorfmüller[1,2], Elie Fadel[1,2], David Montani[1,2,4], Saadia Eddahibi[1,2], Marc Humbert[1,2,4], Christophe Guignabert[1,2,*].

[1]INSERM UMR 999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; [2]Univ Paris-Sud, Orsay, France; [3]VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; [4]AP-HP, Antoine-Béclère Hospital, Clamart, France.

*Address correspondence to: Christophe Guignabert, Ph.D; INSERM UMR 999; Centre Chirurgical Marie Lannelongue; 133, avenue de la Resistance; 92350 Le Plessis-Robinson, France. Tel: +33 1 40948833; Fax: +33 1 40942522; christophe.guignabert@inserm.fr

Authors' contributions: Conception and design: LT, F.S.dM, DM, MH, CG; Analysis and interpretation: all; Drafting manuscript: MH and CG.

Running title: p130^{Cas} Over-Expression in Pulmonary Hypertension

Funding footnote: This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the French National Agency for Research: grant no P007948 ANR-GENOPATH "ATOL", and the Legs Poix (Chancellerie des Universités de Paris). F.S.dM. (MC 1120-2009) is the recipient of a European Respiratory Society/ Marie-Curie Joint Research Fellowship

Manuscript word count: 3494

"This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org"

Scientific knowledge on the subject

- Increased proliferation/ migration of pulmonary vascular cells are hallmark pathogenic features of pulmonary arterial hypertension (PAH). The mechanisms underlying these abnormalities, however, remain partially unknown.
- Recent discovery of selective therapies targeting crucial receptor tyrosine kinase (RTK) signaling in idiopathic PAH (iPAH) such as EGF, FGF2 and PDGF has provided encouraging experimental results, and these agents are being tested as a potential therapeutic approach to PAH
- p130^{Cas} is an adaptor protein modulating several signaling pathways that controls cell-migration and proliferation.

What this study adds to the field

- Adapter p130^{Cas} protein and activity are increased: **(1)** in serum and walls of pulmonary arteries and in cultured pulmonary endothelial (P-ECs) and smooth muscle cells (PA-SMCs) from iPAH-patients as compared to those from controls; **(2)** in experimental models of PAH in rodents (chronic hypoxia-induced PAH in mice and monocrotaline-induced PAH in rats).
- EGF, FGF2 and PDGF signaling pathways converge to p130^{Cas} which acts as an amplifier of downstream signals
- Decreasing p130^{Cas}-signaling by RNA-interference attenuate the increase in ERK1/2 activation state and normalized migration and proliferation of PA-SMCs and P-ECs derived from iPAH patients.

These findings offer new insight into the importance of p130^{Cas} in PAH for proliferation and migration of pulmonary vascular cells, and for the intracellular transmission of the signal induced by the major RTKs. We obtained evidence for convergence and amplification of the growth-stimulating effect of EGF, FGF2 and PDGF signaling pathways via p130^{Cas} signaling pathway. There are no selective p130^{Cas} inhibitors currently available, but these results should stimulate work on the design and synthesis of such inhibitors, and encourage their evaluation in experimental models of PAH.

For Review Only

ABSTRACT

Rationale: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease characterized by pulmonary arterial muscularization due to excessive pulmonary vascular cell proliferation and migration, a phenotype dependent upon growth factors and activation of receptor tyrosine kinases (RTKs). $p130^{Cas}$ is an adaptor protein involved in several cellular signaling pathways that control cell migration, proliferation and survival.

Objectives: We hypothesized that in experimental and human PAH $p130^{Cas}$ signaling is over-activated, thereby facilitating the intracellular transmission of signal induced by fibroblast growth factor (FGF)-2, epidermal growth factor (EGF), and platelet-derived growth factor (PDGF).

Measurements and Main Results: In PAH patients, levels of $p130^{Cas}$ protein and/or activity are higher in the serum, in walls of distal pulmonary arteries, in cultured smooth muscle (PA-SMCs) and pulmonary endothelial cells (P-ECs) than controls. These abnormalities in the $p130^{Cas}$ signaling were also found to be in the chronically hypoxic mice and monocrotaline-injected rats as models of human PAH. We next obtained evidence for convergence and amplification of the growth-stimulating effect of EGF, FGF2 and PDGF signaling pathways via $p130^{Cas}$ signaling pathway. Finally, we found that daily treatment with each of the EGF-R inhibitor gefitinib, the FGF-R inhibitor dovitinib and the PDGF-R inhibitor imatinib started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuate the abnormal increase in $p130^{cas}$ and ERK1/2 activation and regress established PAH.

Conclusions: Our findings demonstrate that $p130^{Cas}$ signaling plays a critical role in experimental and iPAH by modulating pulmonary vascular cell migration, proliferation and by acting as an amplifier of RTKs downstream signals.

Word count: *250 words*

Keywords: *Pulmonary arterial hypertension • Pulmonary vascular remodeling • Growth factors • Signal transduction • BCAR1*

For Review Only

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disease of unknown etiology characterized by a marked and sustained increase in pulmonary artery pressure (PAP) that ultimately leads to right ventricular failure and death. Currently, there is no cure for PAH and the therapeutic options available only partially improve symptoms and increase survival. In the absence of specific treatments, patients with idiopathic PAH (iPAH) have a mean survival of 2.8 yr. Even under current therapies survival remains poor with a 15% death-rate per year in incident iPAH patients(1, 2). Irreversible remodeling of the pulmonary vasculature is the cause of increased PAP in PAH and frequently leads to progressive functional decline in patients despite treatment. This process is ascribed to the increased proliferation, survival and migration of pulmonary vascular cells, including SMCs and ECs. However, the mechanisms that mediate these effects are incompletely understood.

Over recent years, there has been growing interest in the disease-promoting roles of three different growth factors: PDGF, EGF, and FGF2. Altered expression and/ or increased activity of these RTKs have been reported in human and experimental models of PAH and their inhibition by specific inhibitors (TKIs) reverses experimental PAH in rodents(3-7). In some cases, clinical improvements with some TKI have been documented, but partly because of their lack of selectivity, serious side-effects often limit their use in patients with PAH. A better understanding of the signaling through these RTKs may contribute to the development of new, better-tolerated and more powerful therapeutic tools.

$p130^{Cas}$ is an adaptor protein involved in the regulation of several cellular signaling pathways that control cell motility, proliferation and survival(8). In particular, knockdown of $p130^{Cas}$ causes proliferative arrest in breast cancer cell lines harboring oncogenic mutations in KRAS, BRAF, PTEN, and PIK3CA(8), implicating $p130^{Cas}$ as a general regulator of breast cancer cell growth induced by various oncogenes. Furthermore, $p130^{Cas}$ tyrosine phosphorylation (active form) has been demonstrated in response to stimulation of a wide variety of cell surface receptors including RTKs and G-protein-coupled receptors in various

For Review Only

cell types(9-12). We investigated: **1)** the p130^{Cas} levels in the serum of iPAH patients and controls; **2)** the *in situ* presence and activity of p130^{Cas} within walls of iPAH and control pulmonary arteries; **3)** whether or not intrinsic abnormalities in p130^{Cas} signaling are characteristic of P-ECs and PA-SMCs from iPAH patients*;* **4)** whether or not p130^{Cas} is a potential target in RTK signaling pathways, particularly in the control of proliferation and/or migration of iPAH pulmonary vascular cells; **5)** lung levels of p130^{Cas} protein and activity in two rodent models of PAH; **6)** the efficacy of gefitinib, dovitinib and imatinib treatments on the abnormal increase in ERK1/2 and p130^{cas} activation states and on the progression of monocrotaline-induced PAH.

For Review Only

METHODS

Study Population

Blood samples and clinical data from 37 PAH patients (n=21 iPAH; n=16 heritable PAH) and from 40 controls were collected (Supp.Table.1). For *the in vitro* and *in situ* studies, we studied lung specimens obtained during lung transplantation in 7 iPAH patients and during lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer in 7 controls (Supp.Table.2). Preoperative echocardiological evaluation including echocardiography was performed in the controls to rule out PAH, and the lung specimens from the controls were collected at distance from tumor foci. This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France). All patients gave informed consent before the study.

Isolation, Culture and Functional Analysis of Human PA-SMCs and P-ECs

Human PA-SMCs and P-ECs were isolated and cultured as previously described(3, 13). Proliferation and migration were respectively assessed by a 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation(7) and a modified Boyden chamber migration assay(14).

Western blot, ELISA, Gelatin Zymography and Immunostaining

Cells were homogenized and sonicated in PBS containing protease and phosphatase inhibitors and 30 µg of protein was used to detect $p130^{Cas}$ (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), phospho-(Y165)-$p130^{Cas}$ (Ozyme, Saint-Quentin-Yvelines, France), phospho-ERK1/2, ERK1 (Tebu-Bio) and β-actin (Sigma-Aldrich) as previously described(7). Circulating $p130^{cas}$ levels were assayed using a human $p130^{cas}$ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Shanghai Boyun Biotech Co., Ltd. Shanghai, China). Gelatin zymography, immunohistochemistry and immunocytofluorescent staining were performed as previously described(7, 14, 15).

Animal Models and Hemodynamic Measurements

Young male Wistar rats (100 g) were studied 4 weeks after a single subcutaneous injection of monocrotaline (60 mg/Kg) or vehicle(13). In an additional experiment, 20 rats given monocrotaline were left untreated for 2 weeks then randomly divided into four groups and treated for 2 weeks with daily intraperitoneal injections of: imatinib (50 mg/kg/day(6)), gefitinib (50 mg/kg/day(16)), dovitinib (30 mg/kg/day(17)), and vehicle (dimetyl sulfoxide). C57BL/6 mice (12 weeks of age) were either studied in room air, or exposed to hypoxia (10% oxygen) for 3 weeks(18, 19). Animals were anesthetized with isoflurane. A polyvinyl catheter was introduced into the right jugular vein and pushed through the right ventricle into the pulmonary artery. Another polyethylene catheter was inserted into the right carotid artery. After measurement of hemodynamic parameters, the thorax was opened and the left lung immediately removed and frozen. The right lung was fixed in the distended state with formalin buffer. The right ventricular hypertrophy (RVH) index and the percentage of muscularized vessels were determined as previously described(15). Animal studies were approved by the administrative panel on animal care at Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

For Review Only

Statistical Analyses

Statistical significance was tested using the nonparametric Mann-Whitney test or two-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests.

RESULTS

Serum p130^{Cas} Protein Levels Are Increased in PAH Patients

Although no significant difference was noted between iPAH and hPAH (*P*=0.075, NS), a substantial increase in circulating p130^{Cas} protein levels was observed in the serum of PAH patients compared with controls (1.02±0.21 *vs.* 0.29±0.07 ng/mL; *P*<0.001) (Fig.1).

Adapter p130^{Cas} Protein and Activity Are Increased in Lungs and Cultured Pulmonary Vascular Cells Derived From iPAH Patients

We next quantified and localized p130^{Cas} protein in lungs and found that phospho-p130^{Cas} and p130^{Cas} were abundant in walls of iPAH pulmonary arteries; in contrast, the p130^{Cas} signal was weak in vessels from controls (Fig.2A). SMC and EC were the major sites of p130^{Cas} over-expression, so we investigated amounts of p130^{Cas} and its phosphorylation state in primary PA-SMC and P-EC cultures generated from these human lung specimens. Consistent with our immunohistochemical findings, iPAH PA-SMCs (Fig.2B) and P-ECs (Fig.2C) contained more p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} proteins than control cells. Confocal microscopy studies confirmed the higher p130^{Cas} activation state in iPAH than in control cells (Fig.2D-E).

p130^{Cas} Facilitates The Proliferative and Migratory Actions of EGF, PDGF, and FGF2 in Cultured P-ECs and PA-SMCs

Next, we investigated the functional importance of p130^{Cas} in these cells and assessed whether p130^{Cas} may be a potential target for reducing or blocking proliferation and migration

For Review Only

induced by RTKs. We evaluated the proliferative and migration potential of PA-SMCs with and without $p130^{Cas}$ inhibition by RNA-interference. Transfecting PA-SMCs with $p130^{Cas}$-siRNA decreased $p130^{Cas}$ protein abundance by 86% with respect to transfection with scrambled-siRNA (Supplemental Fig.S1). Decreasing $p130^{Cas}$ similarly reduced both the proliferative and migration potentials of iPAH and control PA-SMCs under basal conditions (Fig.3A-B). Decreasing $p130^{Cas}$ levels reduced the iPAH PA-SMC proliferation induced by EGF, FGF2, and PDGF by 59%, 64%, and 60%, respectively. PDGF, and in particular PDGF-BB, is one of the major stimulating migratory factors for arterial SMCs(20). We found that transfecting PA-SMCs with $p130^{Cas}$-siRNA reduced the PDGF-induced migration of iPAH SMCs substantially more than that of control cells. In addition, treatments of PA-SMCs transfected with $p130^{Cas}$-siRNA with either growth factor still offered significant increase in proliferation and migration compared to basal condition (Figure 3A-B).

Matrix metalloproteinase (MMP)-2 facilitates SMC migration by degradation of the basement membrane and the extracellular matrix. We therefore determined whether the chemotactic migratory behavior of PA-SMCs was impaired by loss of $p130^{Cas}$ in association with reduced MMP-2 activity. Consistent with a previous report, we found that conditioned media from iPAH PA-SMCs contained more MMP-2 than that from control cells(21). Decreasing $p130^{Cas}$ by siRNA markedly reduced MMP-2 levels to similar levels in conditioned media from iPAH and control-PA-SMCs (Fig.3C).

Similar to findings for PA-SMCs, we also showed that the increased $p130^{Cas}$ is necessary for the heightened response of iPAH P-ECs to EGF, FGF, and PDGF (Fig.4). Decreasing $p130^{Cas}$ reduced iPAH P-EC proliferation by 78% and iPAH P-ECs migration by 75% under basal conditions (Fig.4A-B).

EGF, FGF2 and PDGF Signaling Pathways Converge to $p130^{Cas}$ Which Acts as an Amplifier of Downstream Signals

Then, we studied how increased $p130^{Cas}$ might contribute to the pathogenesis of PAH and its role in the transduction of the RTK signaling pathways. First, we analyzed its activation

For Review Only

state in control and iPAH PA-SMCs in both basal conditions and following exposure to exogenous EGF, FGF2, and PDGF in presence or in absence of 1µM gefitinib, dovitinib or imatinib, respectively. Phospho-p130^{Cas} levels were markedly increased by stimulation with any of these three different growth factors for 15 minutes; also, the phospho-p130^{Cas} levels were even higher in iPAH PA-SMCs than in control cells (Fig.5A-B). Pre-treatment of control and iPAH PA-SMCs with either TKIs for 30 minutes before exposure to either exogenous growth factor substantially attenuates the increase in p130^{cas} activation (Fig.5A-B).

To investigate whether p130^{Cas} served as an amplifier/ transmitter of downstream signals, we conducted parallel evaluations of the ERK1/2 activation states in control and iPAH PA-SMCs exposed to either EGF, FGF2 or PDGF in absence or in presence of either TKIs, p130^{cas}-siRNA or scrambled sequence. A marked increase in levels of phospho-ERK1/2 was observed following exposure to either growth factor, and this effect was even more pronounced on IPAH PA-SMCs (Fig.5A-C). Inhibition of EGF-R, FGF-R and PDGF-R respectively resulted in a substantial reduction in the ERK1/2 activation state in both control and iPAH PA-SMCs (Fig.5A-C). In addition, decreasing p130^{Cas}-signaling by RNA-interference significantly attenuate the increased levels of phospho-ERK1/2 observed following exposure to exogenous EGF, FGF2 and PDGF (Fig.5D-E). Compared with PA-SMCs transfected with p130^{Cas}-siRNA under basal conditions, treatments with these growth factors offered significant increase in levels of phospho-ERK1/2, strongly supporting that p130^{Cas} is an amplifier of RTKs downstream signals.

Adapter p130^{Cas} Protein and Activity Are Increased in Rat Lungs With Monocrotaline-induced PAH and in Mouse Lungs With Chronic Hypoxia-induced PAH

We next examined the protein expression pattern of p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} in lungs from rodent models of PAH. Rats receiving a single subcutaneous injection of monocrotaline developed PAH within 15 days and it further aggravated until 30 days as reflected by the significant increase in mPAP, RVH and pulmonary arterial muscularization (Supplemental

For Review Only

Fig.S2). Consistent with our findings in human lungs, we showed that p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} are substantially increased in rat lungs with monocrotaline-induced PAH as well as in mouse lungs with chronic hypoxia-induced PAH (Supplemental Fig.S3 and Fig.6A-B).

Efficacy of Gefitinib, Dovitinib and Imatinib Treatment on the Progression of Monocrotaline-induced PAH and on the Abnormal Increase of p130^{Cas} Activity

Daily treatment with each of the three clinically approved TKIs started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuate the abnormal increase in p130^{cas} activation and regress established PAH (Fig.7). In rats treated with vehicle from day-15 to day-30, a marked increase in mPAP, RVH and numbers of muscularized distal pulmonary arteries were found compared with controls. In contrast, when rats were given gefitinib, dovitinib or imatinib and compared to vehicle-treated rats, these hemodynamic parameters as well as the pulmonary vascular remodeling were substantially attenuate. Day-30 mPAP values, RVH and muscularization of pulmonary arteries in imatinib-treated rats were similar to those in controls.

To investigate the efficacy of TKI treatments on the abnormal increase of p130^{Cas} protein and activity, we conducted parallel evaluations of the p130^{Cas} activation states and found that lung levels of p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} were markedly attenuate when compared to vehicle-treated rats (Fig.7B). On day-30, the number of PCNA-positive cells (Fig.7C) was significantly lower in pulmonary-artery walls from either TKI-treated rats than in walls from vehicle-treated rats and we found that these changes were accompanied by a marked reduction in the phosphoERK1/2:ERK1 ratio. There were no significant differences between rats given vehicle or TKIs regarding body weight, systemic blood pressure, or heart rate.

Effect of Gefitinib, Dovitinib and Imatinib on Human P-EC and PA-SMC Proliferation

EGF, FGF2 and PDGF significantly increased proliferation of cultured human PA-SMCs and P-ECs, however TKIs significantly inhibited cell proliferation. Pretreatment with gefitinib,

For Review Only

dovitinib or imatinib (30 minutes) dose-dependently reduced the growth of iPAH and control PA-SMCs treated with EGF, FGF2 or PDGF, respectively (Fig.8A). These growth-stimulating effects are even more reduced by TKIs in iPAH PA-SMCs than in control PA-SMCs. A similar pattern of inhibition was observed in P-ECs treated with either growth factor (Fig.8B).

DISCUSSION

Migration and proliferation of ECs and SMCs constitute an essential part of the pulmonary vascular remodeling seen in PAH. Herein, we reported evidence that $p130^{Cas}$ and its signaling plays a critical role in the PAH pathogenesis by modulating pulmonary vascular cell migration, proliferation and by acting as an amplifier of RTKs downstream signals. We showed that the adapter $p130^{Cas}$ protein and activity are increased in the serum and in walls of distal pulmonary arteries and in cultured P-ECs and PA-SMCs from iPAH patients. We obtained evidence for convergence and amplification of the growth-stimulating effect of EGF, FGF2 and PDGF signaling pathways via $p130^{Cas}$ signaling pathway. In addition, we showed that the EGF-R inhibitor gefitinib, the FGF-R inhibitor dovitinib and the PDGF-R inhibitor imatinib dose-dependently reduced the growth-stimulating effect of EGF, FGF2 or PDGF and substantially attenuate the increase in $p130^{cas}$ activation. Finally, we found that $p130^{Cas}$ protein and activity are increased in rat lungs with monocrotaline-induced PAH as well as in mouse lungs with chronic hypoxia-induced PAH; daily treatment with either TKI started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuate the abnormal increase in $p130^{cas}$ activation and regress established PAH, as judged on mPAP, RVH, and pulmonary arterial muscularization.

Tyrosine phosphorylation events mediated by aberrant activation of EGF-R, FGF-R and PDGF-R pathways have been proven to be involved in the development of several diseases including cancer and PAH(3-7, 22, 23). Inhibition of these specific RTK signaling decreases the abnormal proliferation and migration of pulmonary SMCs and ECs in human

and experimental PAH and may represent an attractive treatment for PAH. After promising phase I/II results, imatinib is moving into a phase III trial in PAH(24). All these elements support the idea that a better understanding of these signaling pathways in the pulmonary vasculature will help us understand the mechanism of pulmonary vascular remodeling and provide new or more powerful therapeutic tools/ targets for PAH.

RTK activity in resting and normal cells is tightly controlled. Upon ligand binding and activation, the intracellular catalytic domain of RTKs catalyzes receptor autophosphorylation of cytoplasmic tyrosine residues serving as docking sites for SH2- and phosphotyrosine-binding-containing molecules. Assembly of activated protein complexes triggers signaling cascades that can activate or repress genes involved in cell proliferation, migration and survival. Among these key intracellular transducers of these RTKs signals, $p130^{Cas}$ is a central multi-domain docking protein, with an N-terminal SH3 domain, a central "substrate domain" consisting of multiple SH2-domain binding motifs (Tyr-x-x-Pro), and a "Src-binding domain" near the C-terminus(25, 26). $p130^{Cas}$ is regulated in part by a phosphorylation (active form)/ dephosphorylation mechanism. The tyrosine phosphorylation of the $p130^{Cas}$ substrate domain is due mostly to the activity of Src and focal adhesion kinase(27). However, little is known regarding the role of $p130^{Cas}$ in the aberrant activation of RTK pathways in PAH for which there is a need for development of effective targeted therapies. We found a marked increase in $p130^{Cas}$ protein levels in tissue and serum of iPAH patients. Although the mechanism(s) that lead to abundance of the protein in serum is not fully understood, an elevated expression of $p130^{Cas}$ in tissue as well as in serum of patients with either non-small-cell lung cancer or pulmonary tuberculosis has been recently reported by Bo Deng *et al.*(28). These *in situ* observations were confirmed *in vitro*, with cultured human PA-SMCs and P-ECs exhibiting increased expression and activity of $p130^{Cas}$, providing evidence that $p130^{Cas}$ over-expression/ over-activity in iPAH pulmonary vascular cells is an intrinsic abnormality of these cells. The tissue sections and cells we studied were from patients with end-stage PAH receiving drug therapy, so we cannot exclude the possibility

For Review Only

that these abnormalities represent a compensatory mechanism and are not associated with early stage vascular remodeling in PAH. Although determinations of serum $p130^{Cas}$ levels were also performed in less severe PAH patients, at this time we can only conclude that these abnormalities in $p130^{Cas}$ signaling are present at least throughout the last stages of the disease aggravation.

Over-abundance and over-activity of $p130^{Cas}$ signaling may contribute at multiple levels to pulmonary vascular remodeling seen in PAH. First, $p130^{Cas}$ signaling is known to modulate cellular proliferation. $p130^{Cas}$ is over-produced in many human cancers, and $p130^{Cas}$ is required for KRAS, BRAF, PTEN and PIK3CA oncogene-dependent proliferation(29) as well as for transformation by several oncogenes, such as Src, ERBB2, and the nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase(30). It has been reported that $p130^{Cas}$ confers resistance to anticancer drugs such as doxorubicin and tamoxifen via activation of signaling pathways mediated by various kinases, including Src, EGF-R, protein kinase B (AKT) and ERK1/2(31, 32). In breast cancer patients, elevated $p130^{Cas}$ levels are associated with a decreased response to tamoxifen therapy, early disease recurrence, and lower long-term survival(33). The tamoxifen resistance conferred by $p130^{Cas}$ has been linked to Src-driven cell proliferation and survival pathways mediated either in complex with the estrogen receptor to promote ERK signaling and cyclin D1 induction or to an estrogen receptor-independent manner involving EGF-R and Stat5b(8, 34-36). c-Src is abundant in vascular tissue(37) and Courboulin *et al.*(38) showed a basal over-activation of the Src–STAT3 pathway in iPAH PA-SMCs, supporting the hypothesis that $p130^{Cas}$ signaling may be abnormally activated, thereby indirectly promoting cell growth and migration. Here, we showed that siRNA mediated knockdown of $p130^{Cas}$ significantly diminished the proliferative potential of iPAH PA-SMCs and P-ECs. In addition, we found that the growth-stimulating effect of EGF, FGF2 or PDGF is also substantially reduced in both cell types with more pronounced effects in iPAH cells. Second, a role for $p130^{Cas}$ signaling in migration of fibroblasts has been well documented. Impaired migration capacity of $p130^{Cas}$-null mouse

For Review Only

embryo fibroblasts can be restored by ectopic expression of wild-type p130^{Cas} but not by mutants lacking the sites of tyrosine phosphorylation in the substrate domain(39, 40). We found that siRNA mediated knockdown of p130^{Cas} significantly reduced the migratory potential of iPAH PA-SMCs and P-ECs. Third, we demonstrated that p130^{Cas} acts as an amplifier of EGF-R, FGF-R and PDGF-R downstream signals. In control and iPAH PA-SMCs, we found a rapid and sustained increase in the ERK1/2 and p130^{Cas} activation states following exposure to exogenous EGF, FGF2 and PDGF. Decreasing p130^{Cas}-signaling by RNA-interference significantly attenuates growth factor-induced ERK activation. However, treatments of PA-SMCs transfected with p130^{Cas} siRNA with either growth factor still offered significant increase in levels of phospho-ERK1/2, supporting the notion that p130^{Cas} is an amplifier of RTKs downstream signals. Signaling via the p130^{Cas}/Crk complex also promotes cell survival via activation of ERK and Rac pathways(41, 42), and it has been reported that uncoupling of p130^{Cas} and Crk is required for c-Abl-mediated apoptosis to take place(43).

Altered bone morphogenetic protein (BMP)/TGF-β signaling is now recognized as a major factor in the PAH pathogenesis (44). Interestingly, a previous study from Kim *et al.*(45) demonstrates that p130^{Cas} is also a negative modulator of the TGF-β signaling pathway by binding to smad3 and preventing its phosphorylation by the TGFβ receptor. In mammary epithelial cells, p130^{cas} overexpression shifts TGFβ signaling from smad2 and smad3 phosphorylation to p38 MAPK activation, rendering these cells resistant to TGFβ-induced growth arrest and enhancing their metastatic potential(46).

Although the vascular changes that occur in response to monocrotaline injection in rats do not reflect the complex pulmonary vascular lesions seen in PAH patients, our results support a pathophysiological role for p130^{Cas} in PAH. First, we demonstrate an increase in p130^{Cas} expression and activity within walls of remodeled pulmonary arteries of monocrotaline-injected rats and chronically hypoxic mice. Second, we found that daily treatment with imatinib, gefitinib, or dovitinib started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuate the abnormal increase in p130^{cas} activation

For Review Only

and regress established PAH. Third, we found that either TKIs *in vivo* and *in vitro* not only decreased the $p130^{Cas}$ and ERK1/2 activation states, but also directly inhibit pulmonary vascular cell proliferation. There are no selective $p130^{Cas}$ inhibitors currently available, but these results should stimulate work on the design and synthesis of such inhibitors, and encourage their evaluation in experimental PAH.

In summary, our study provides the first evidence that adapter $p130^{Cas}$ protein and activity are abnormally increased in both pulmonary artery walls and cultured pulmonary vascular cells from PAH patients. Although further experiments are required to identify the exact mechanism underlying the over-expression of $p130^{Cas}$ in pulmonary vascular cells, we clearly show the critical involvement of $p130^{Cas}$ in regulating migration and proliferation of these cells. We report strong evidence that $p130^{Cas}$ acts as a nodal signaling platform on which several RTK signaling pathways converge, supporting the idea that $p130^{Cas}$ facilitates the intracellular transmission of the signal induced by major RTKs in iPAH.

For Review Only

Acknowledgments

We thank Dr. Elodie Gouadon for her very helpful technical assistance with use of the Confocal Microscope.

Conflict of interest

None.

Disclosures

None.

For Review Only

References

1. 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, Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010;122:156-163.
2. Humbert M, Sitbon O, Yaici A, Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, Parent F, Savale L, Natali D, Gunther S, Chaouat A, Chabot F, Cordier JF, Habib G, Gressin V, Jing ZC, Souza R, Simonneau G. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2010;36:549-555.
3. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Dartevelle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived fgf2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009;119:512-523.
4. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 2005;112:423-431.
5. Perros F, Montani D, Dorfmuller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:81-88.
6. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by pdgf inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811-2821.
7. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevelle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered

For Review Only

endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:311-322.

8. Cabodi S, Tinnirello A, Di Stefano P, Bisaro B, Ambrosino E, Castellano I, Sapino A, Arisio R, Cavallo F, Forni G, Glukhova M, Silengo L, Altruda F, Turco E, Tarone G, Defilippi P. P130cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and her2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res* 2006;66:4672-4680.
9. Cabodi S, del Pilar Camacho-Leal M, Di Stefano P, Defilippi P. Integrin signalling adaptors: Not only figurants in the cancer story. *Nat Rev Cancer* 2010;10:858-870.
10. Korah R, Choi L, Barrios J, Wieder R. Expression of fgf-2 alters focal adhesion dynamics in migration-restricted mda-mb-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2004;88:17-28.
11. Ojaniemi M, Vuori K. Epidermal growth factor modulates tyrosine phosphorylation of p130cas. Involvement of phosphatidylinositol 3'-kinase and actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1997;272:25993-25998.
12. Pellet-Many C, Frankel P, Evans IM, Herzog B, Junemann-Ramirez M, Zachary IC. Neuropilin-1 mediates pdgf stimulation of vascular smooth muscle cell migration and signalling via p130cas. *Biochem J* 2011;435:609-618.
13. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005;111:2812-2819.
14. El-Bizri N, Guignabert C, Wang L, Cheng A, Stankunas K, Chang CP, Mishina Y, Rabinovitch M. Sm22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1a in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development* 2008;135:2981-2991.
15. Guignabert C, Tu L, Izikki M, Dewachter L, Zadigue P, Humbert M, Adnot S, Fadel E, Eddahibi S. Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary

For Review Only

hypertension in mice with sm22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *Faseb J* 2009;23:4135-4147.

16. Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, Ghofrani HA, Weissmann N, Voswinckel R, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*;181:158-167.
17. Azab AK, Azab F, Quang P, Maiso P, Sacco A, Ngo HT, Liu Y, Zhang Y, Morgan BL, Roccaro AM, Ghobrial IM. Fgfr3 is overexpressed waldenstrom macroglobulinemia and its inhibition by dovitinib induces apoptosis and overcomes stroma-induced proliferation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:4389-4399.
18. Guignabert C, Alvira CM, Alastalo TP, Sawada H, Hansmann G, Zhao M, Wang L, El-Bizri N, Rabinovitch M. Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes pdgf receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1082-1090.
19. Guignabert C, Izikki M, Tu LI, Li Z, Zadigue P, Barlier-Mur AM, Hanoun N, Rodman D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res* 2006;98:1323-1330.
20. Raines EW. Pdgf and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:237-254.
21. Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, Humbert M, Adnot S, D'Ortho MP, Lafuma C. Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005;25:834-842.
22. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by erbb/her receptors. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004;58:903-913.
23. Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Current drug targets* 2003;4:159-179.

For Review Only

24. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1171-1177.
25. Defilippi P, Di Stefano P, Cabodi S. P130cas: A versatile scaffold in signaling networks. *Trends in cell biology* 2006;16:257-263.
26. Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, Hirai H. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-crk and v-src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *Embo J* 1994;13:3748-3756.
27. Ruest PJ, Shin NY, Polte TR, Zhang X, Hanks SK. Mechanisms of cas substrate domain tyrosine phosphorylation by fak and src. *Mol Cell Biol* 2001;21:7641-7652.
28. Deng B, Huang W, Tan QY, Fan XQ, Jiang YG, Liu L, Zhong YY, Liang YG, Wang RW. Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (bcar1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum. *Molecular diagnosis & therapy* 2011;15:31-40.
29. Pylayeva Y, Gillen KM, Gerald W, Beggs HE, Reichardt LF, Giancotti FG. Ras- and pi3k-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest* 2009;119:252-266.
30. Cabodi S, Tinnirello A, Bisaro B, Tornillo G, del Pilar Camacho-Leal M, Forni G, Cojoca R, Iezzi M, Amici A, Montani M, Eva A, Di Stefano P, Muthuswamy SK, Tarone G, Turco E, Defilippi P. P130cas is an essential transducer element in erbb2 transformation. *Faseb J* 2010;24:3796-3808.
31. Ta HQ, Thomas KS, Schrecengost RS, Bouton AH. A novel association between p130cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:8796-8804.
32. van der Flier S, Brinkman A, Look MP, Kok EM, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Dorssers LC, Foekens JA. Bcar1/p130cas protein and primary breast cancer: Prognosis and response to tamoxifen treatment. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:120-127.

For Review Only

33. Dorssers LC, Grebenchtchikov N, Brinkman A, Look MP, van Broekhoven SP, de Jong D, Peters HA, Portengen H, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, van Tienoven DT, Geurts-Moespot A, Span PN, Foekens JA, Sweep FC. The prognostic value of bcar1 in patients with primary breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:6194-6202.
34. Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, Defilippi P. P130cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *Journal of cell science* 2004;117:1603-1611.
35. Dorssers LC, van Agthoven T, Brinkman A, Veldscholte J, Smid M, Dechering KJ. Breast cancer oestrogen independence mediated by bcar1 or bcar3 genes is transmitted through mechanisms distinct from the oestrogen receptor signalling pathway or the epidermal growth factor receptor signalling pathway. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R82-92.
36. Riggins RB, Thomas KS, Ta HQ, Wen J, Davis RJ, Schuh NR, Donelan SS, Owen KA, Gibson MA, Shupnik MA, Silva CM, Parsons SJ, Clarke R, Bouton AH. Physical and functional interactions between cas and c-src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res* 2006;66:7007-7015.
37. Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. Csrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 1999;77:606-617.
38. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S. Role for mir-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* 2011;208:535-548.
39. Honda H, Oda H, Nakamoto T, Honda Z, Sakai R, Suzuki T, Saito T, Nakamura K, Nakao K, Ishikawa T, Katsuki M, Yazaki Y, Hirai H. Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to src-induced transformation in mice lacking p130cas. *Nat Genet* 1998;19:361-365.

For Review Only

40. Shin NY, Dise RS, Schneider-Mergener J, Ritchie MD, Kilkenny DM, Hanks SK. Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in crk-associated substrate (cas) are sufficient to promote cell migration. *J Biol Chem* 2004;279:38331-38337.
41. Cho SY, Klemke RL. Extracellular-regulated kinase activation and cas/crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *The Journal of cell biology* 2000;149:223-236.
42. Chodniewicz D, Klemke RL. Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a cas/crk scaffold. *Biochimica et biophysica acta* 2004;1692:63-76.
43. Holcomb M, Rufini A, Barila D, Klemke RL. Deregulation of proteasome function induces abl-mediated cell death by uncoupling p130cas and c-crkii. *J Biol Chem* 2006;281:2430-2440.
44. 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, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;54:S10-19.
45. Kim W, Seok Kang Y, Soo Kim J, Shin NY, Hanks SK, Song WK. The integrin-coupled signaling adaptor p130cas suppresses smad3 function in transforming growth factor-beta signaling. *Molecular biology of the cell* 2008;19:2135-2146.
46. Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. P130cas is required for mammary tumor growth and transforming growth factor-beta-mediated metastasis through regulation of smad2/3 activity. *J Biol Chem* 2009;284:34145-34156.

For Review Only

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Serum p130^{Cas} Protein Levels. Levels of circulating p130^{Cas} protein were markedly increased in the serum of patients with PAH compared with those from controls. Values are means±SEM.

Figure 2. Over-expression of p130^{Cas} in lungs and cultured pulmonary vascular cells from patients with iPAH. (A) Representative photomicrographs of distal pulmonary arteries in lung sections from controls (panel a and c) and iPAH patients (panels b and d). Scale bar=100µm. Expression of p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} **(B)** in cultured PA-SMCs **(C)** and in P-ECs from iPAH patients and controls. Localization of p130^{Cas} and phospho-p130^{Cas} **(D)** in PA-SMCs and **(E)** in P-ECs. Scale bar= 20µm. Values are means±SEM (n=5).

Figure 3. p130^{Cas} Facilitates The Proliferative and Migratory Actions of 10 ng/mL of EGF, PDGF, and FGF2 in Cultured Human PA-SMCs. (A) Proliferative and **(B)** migration potential of PA-SMCs from patients with iPAH and controls with or without p130^{Cas} inhibition by RNA-interference. **(C)** Representative gelatin zymography and densitometry carried out on conditioned media of human PA-SMCs. Values are means±SEM (n=5).

Figure 4. p130^{Cas} Facilitates The Proliferative and Migratory Actions of 10 ng/mL of EGF, PDGF, and FGF2 in Cultured Human P-ECs. (A) Proliferative and (B) migration potential of P-ECs with or without p130^{Cas} inhibition by RNA-interference. Values are means±SEM (n=5).

Figure 5. EGF, FGF2 and PDGF Signaling Pathways Converge to p130^{Cas} Which Acts as an Amplifier of Downstream Signals. (A) Representative Western blots of phospho-p130^{Cas}, p130^{Cas}, phospho-ERK1/2, ERK1 and β-actin loading controls and **(B)** quantifications of the phospho-p130^{Cas} / p130^{Cas} and **(C)** the phospho-ERK1/2/ ERK1 ratios in iPAH and control PA-SMCs in presence or in absence of EGF, FGF2 or PDGF (10ng/ml) for 15 minutes with or without a 30 minutes pretreatment with 1µM of gefitinib, dovitinib or

For Review Only

imatinib. **(D)** Representative Western blots of $p130^{Cas}$, phospho-ERK1/2, ERK1 and β-actin loading controls and **(E)** quantification of the phospho-ERK1/2/ ERK1 ratio in iPAH and control PA-SMCs with or without $p130^{Cas}$ inhibition by RNA-interference and in presence or in absence of EGF, FGF2 or PDGF (10ng/ml) for 15 minutes. Values are means±SEM (n=5).

Figure 6. Adapter $p130^{Cas}$ Protein and Activity Are Increased in Rat Lungs With Monocrotaline-induced PAH and in Mouse Lungs With Chronic Hypoxia-induced PAH. Representative Western blots of phospho-$p130^{Cas}$, $p130^{Cas}$ and β-actin loading controls, quantifications of the phospho-$p130^{Cas}$/ β-actin and the phospho-$p130^{Cas}$/ $p130^{Cas}$ ratios and representative images of $p130^{cas}$ immunostaining **(A)** in lungs from monocrotaline-injected rats and controls **(B)** and in lungs from mice exposed to chronic hypoxia or to room air. Values are means±SEM (n=5). Scale bar = 50µm in all sections.

Figure 7. Evaluation of the Efficacy of Gefitinib, Dovitinib and Imatinib Treatment on the Progression of Monocrotaline-induced PAH and on the Abnormal Increase of $p130^{Cas}$ Protein and Activity. (A) RVSP, mPAP, RVH and numbers of muscularized pulmonary arteries. **(B)** Representative Western blots of phospho-$p130^{Cas}$, $p130^{Cas}$, phospho-ERK1/2, ERK1 and β-actin loading controls and quantification of the phospho-$p130^{Cas}$/ $p130^{Cas}$ ratio and the phospho-ERK1/2/ ERK1 ratio. Values are means±SEM (n=5). **(C)** Representative images of hematoxylin-eosin (H&E) staining, alpha-smooth muscle actin (αSM-actin) immunostaining, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining and CD-68 immunostaining of monocrotaline-injected rat lungs treated or not with gefitinib, dovitinib, imatinib or vehicle. Scale bar = 50µm in all sections.

Figure 8. Effect of Gefitinib, Dovitinib and Imatinib on Human PA-SMC and P-ECs Proliferation From Patients With iPAH and Controls. Proliferation of control- and iPAH **(A)** PA-SMCs and **(B)** P-ECs under basal conditions and in presence or in absence of fetal calf serum (FCS), EGF, FGF2 or PDGF (10ng/ml) with or without a 30 minutes pretreatment with 1µM of gefitinib, dovitinib or imatinib (24 h). Values are means±SEM (n=5).

For Review Only

Figure 1.

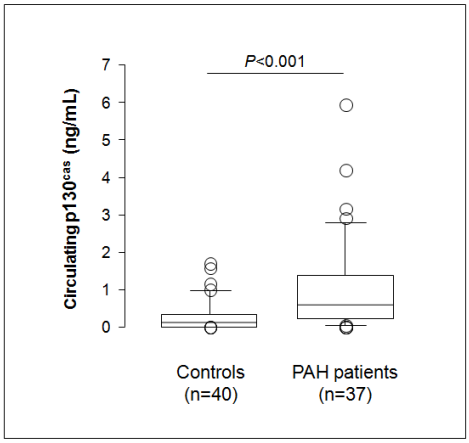

P<0.001
Circulating p130cas (ng/mL)
7
6
5
4
3
2
1
0
Controls
(n=40)
PAH patients
(n=37)

Figure 2.

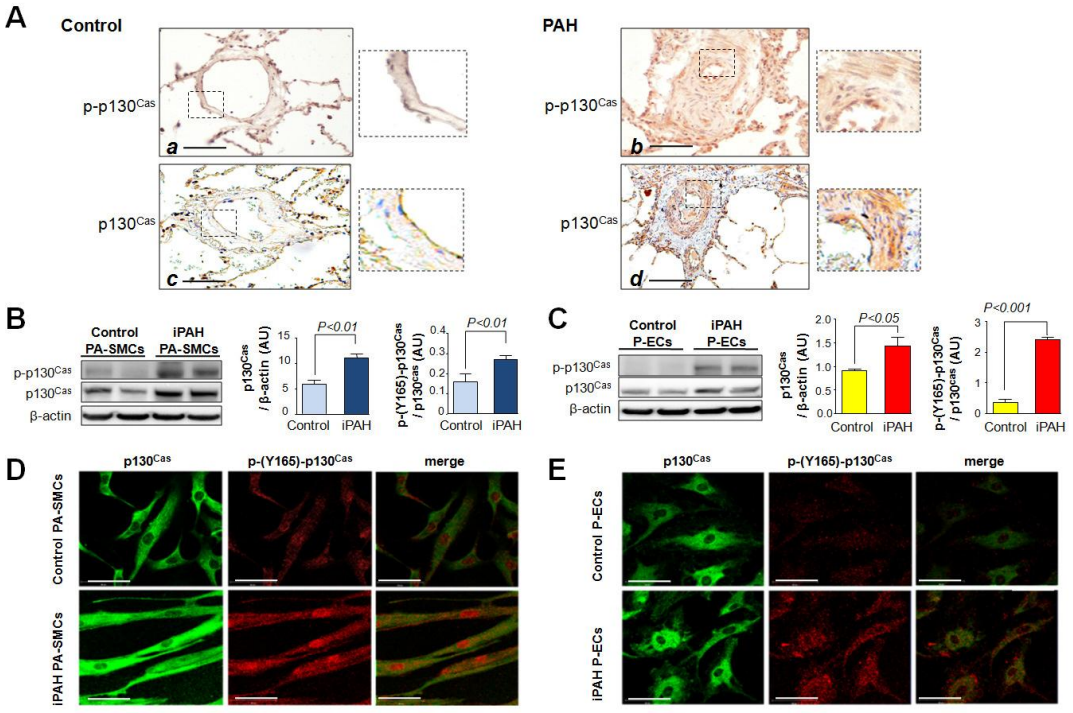


Figure 3.

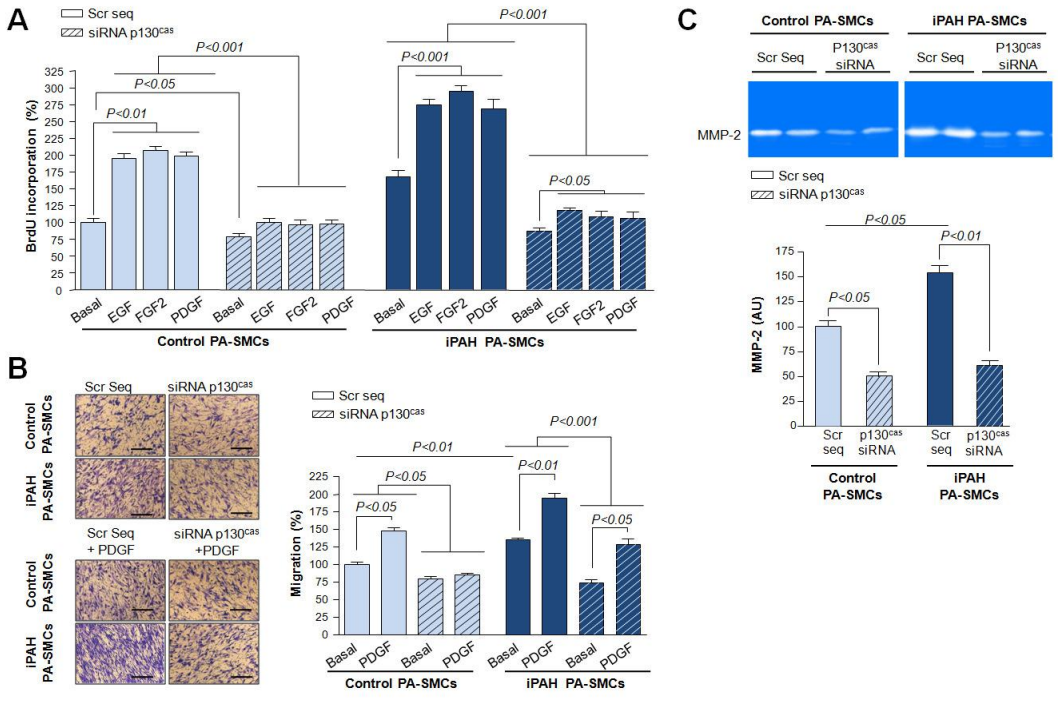


Figure 4.

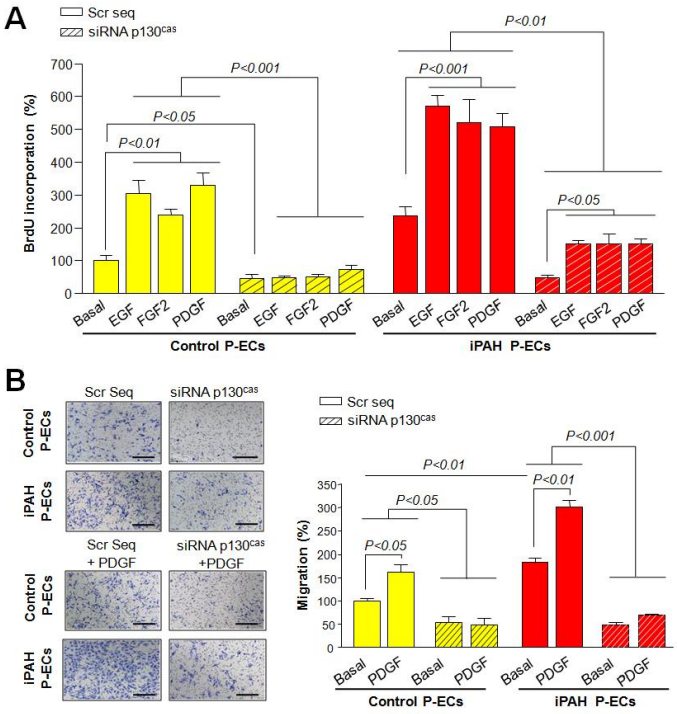


Figure 5. A-C

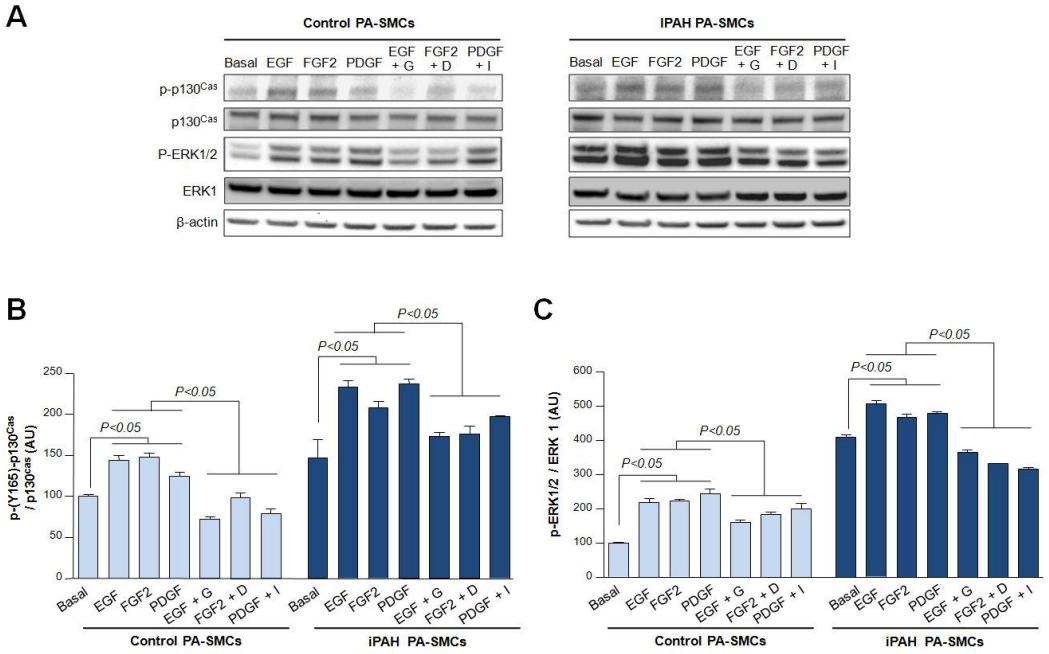


Figure 5. D-E

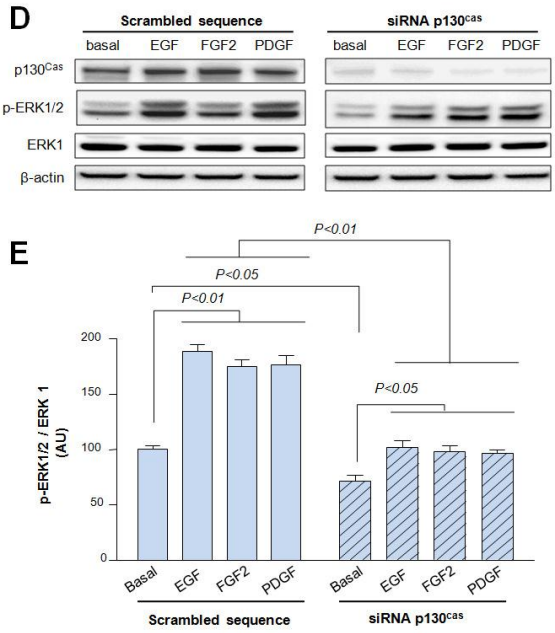
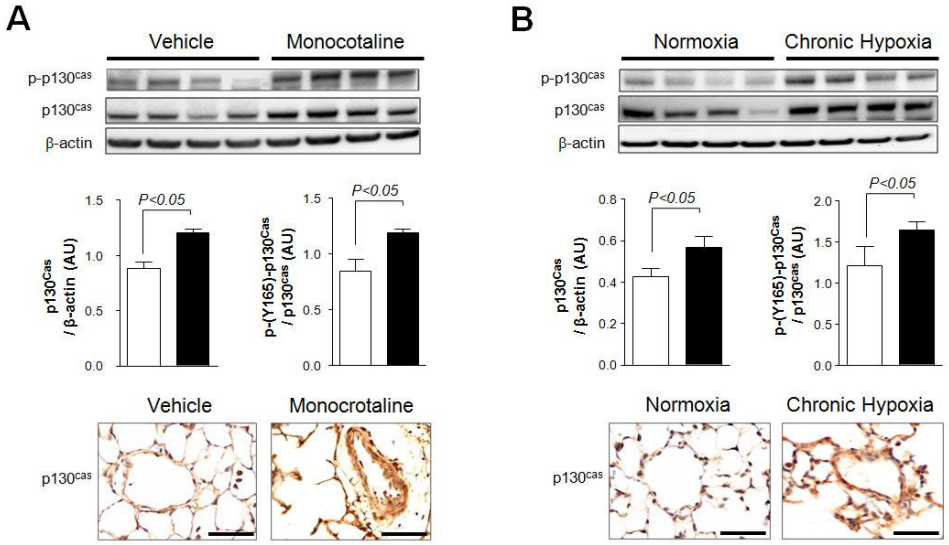
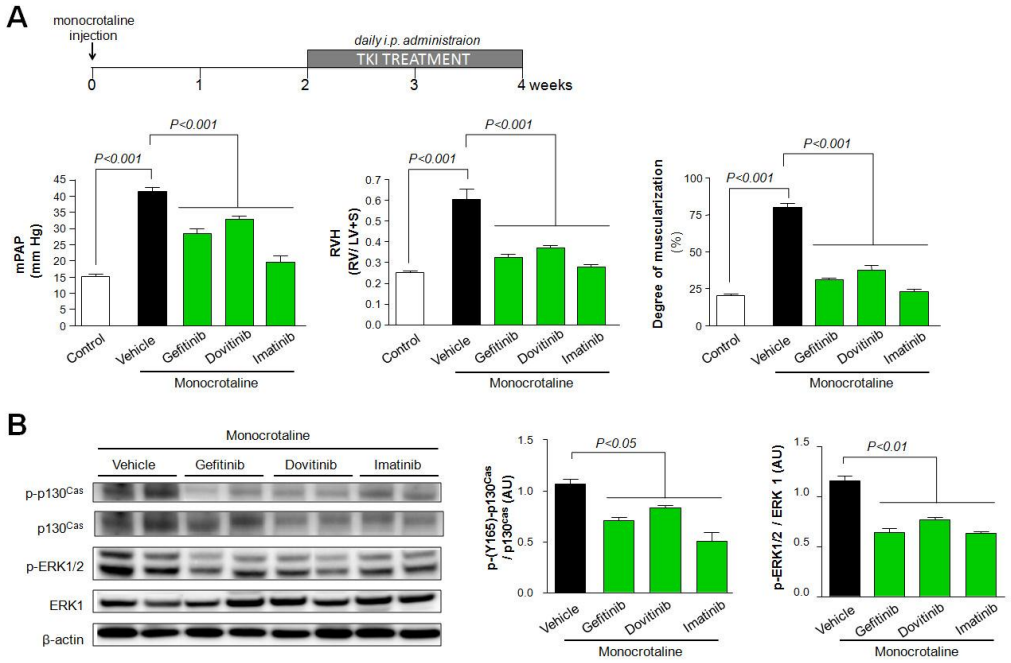


Figure 6.



Page 31 of 43

Figure 7. A-B



Page 33 of 43

Figure 8

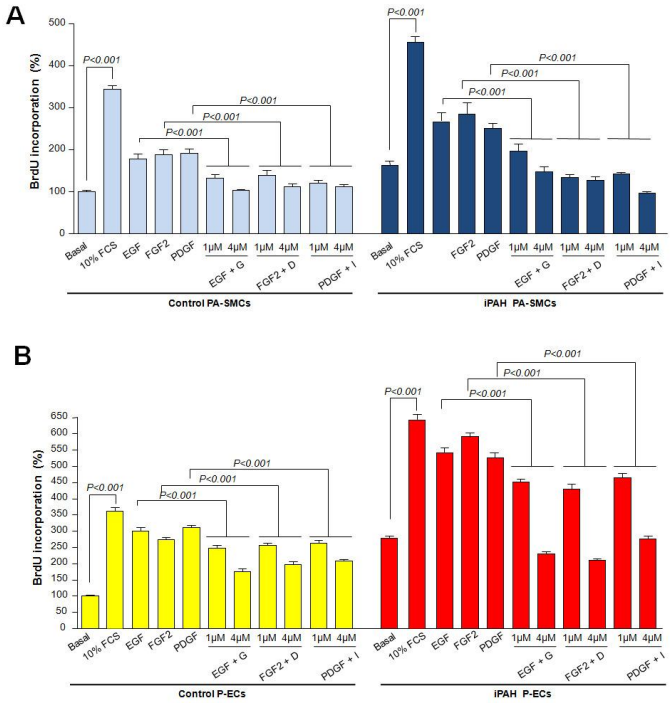


Table 1 - Characteristics Of Controls And Patients With PAH For Determination Of Serum $p130^{cas}$ Protein Levels:

	PAH n=37	Controls n=40
Age, yrs	50.4 ± 2.7	41.9 ± 2.1
Sex, M/F (ratio)	10 / 27 (0.4)	19 / 21 (0.9)
Mutation in *BMPR2* gene, n		
Carrier	16	NA
No-carrier	21	NA
NYHA functional class, n		
class I	1	NA
class II	24	NA
class III	12	NA
6-MWD, m	445 ± 20	NA
mPAP, mmHg	49.3 ± 2.4	NA
CI, l/min/m²	3.10 ± 0.16	NA
PVRi, mmHg/l/min/m²	8.7 ± 0.7	NA
PCWP, mmHg	7.6 ± 0.7	NA
Specific PAH Therapy		
- ERA	31	NA
- PDE5i	27	NA
- Prostanoids	16	NA
- CCB	7	NA
- No Treatment	0	NA

6-MWD=6-minute walk test; CCB=calcium channel blocker; CI=cardiac index; ERA=endothelin receptor antagonists; mPAP=mean pulmonary artery pressure; NA=No applicable; NYHA=New York Heart Association; PCWP=pulmonary capillary wedge pressure; PDE5i=phophodiesterase 5 inhibitors; PVRi= pulmonary vascular resistance index

Table 2 - Characteristics Of Controls And Patients With iPAH Before Lung Transplantation:

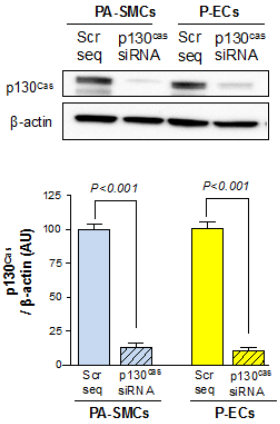
	iPAH n=7	Controls n=7
Age, yrs	39.8 ± 2.2	46.4 ± 2.3
Sex, M/F (ratio)	2 / 5 (0.40)	2 / 5 (0.40)
Mutation in *BMPR2* gene, n		
Carrier	0	NA
No-carrier	7	NA
NYHA functional class, n		
class III	2	NA
class IV	5	NA
mPAP, mmHg	69.9 ± 2.1	NA
CI, l/min/m²	2.6 ± 0.1	NA
PVRi, mmHg/l/min/m²	14.6 ± 0.6	NA
PCWP, mmHg	8 ± 0.5	NA

CI=cardiac index; mPAP=mean pulmonary artery pressure; NA= no applicable; NYHA=New York Heart Association; PCWP=pulmonary capillary wedge pressure; PVRi= pulmonary vascular resistance index

For Review Only

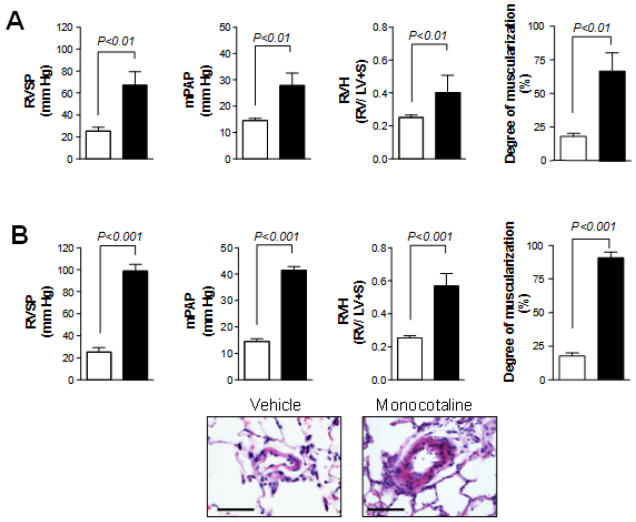
Supplemental Fig.1: Suppression of p130^{Cas} Protein By RNA-interference 72 Hours After Transfection of Human PA-SMCs and P-ECs.
(A) Representative Western immunoblots of p130^{Cas} and β-actin loading controls and quantification of the p130^{Cas}/ β-actin ratio.
Values are means±SEM (n=5).

Fig. S1



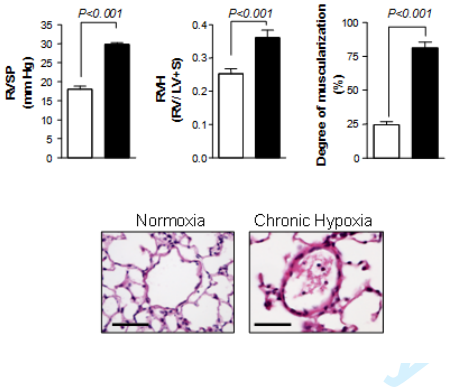
Supplemental Fig.2: Pulmonary Hemodynamic and Vascular Remodeling in Rat Lungs With Monocrotaline-induced PH.
RVSP, mPAP, RVH and numbers of muscularized pulmonary arteries **(A)** at day-15 and **(B)** day 30 in monocrotaline-injected rats and controls.
Values are means±SEM (n=5).

Fig. S2



Supplemental Figure 3: Pulmonary Hemodynamic and Vascular Remodeling in Mouse Lungs With Chronic Hypoxia-induced PH.
RVSP, mPAP, RVH and numbers of muscularized pulmonary arteries in mice exposed to hypoxia (10% fiO_2) or kept in room air for 3 weeks. Values are means±SEM (n=5).

Fig. S3



CD74-Dependent Interleukin-6 and Chemokine Ligand 2 Secretion By Pulmonary Endothelial Cells In Pulmonary Hypertension

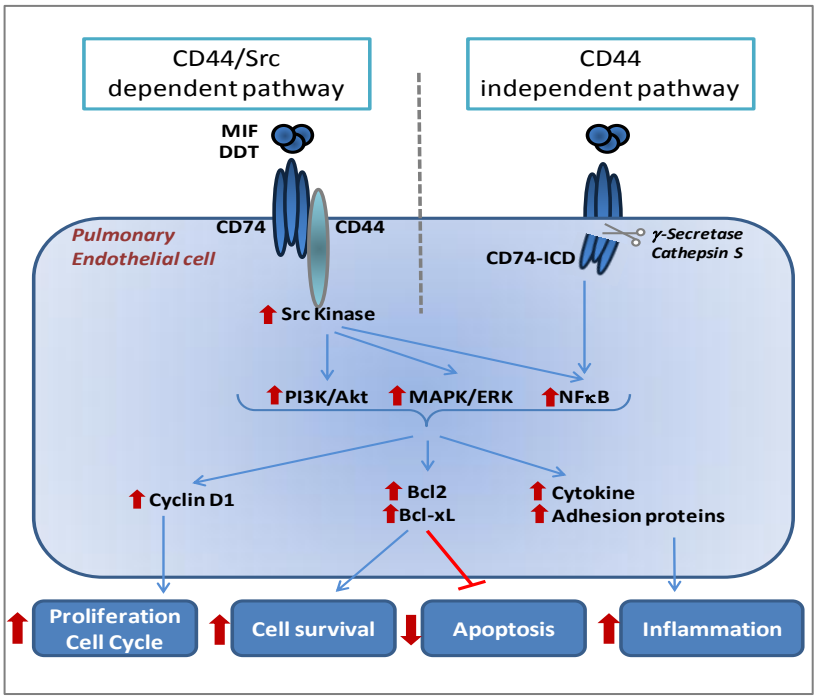
-En cour de préparation-

Ly Tu, Alice Huertas, Nicolas Ricard, Carole Phan, Olaf Mercier, Elie Fadel, David Montani, Marc Humbert and Christophe Guignabert

Introduction

Le CD74 (chaîne invariante, Ii) est une protéine membranaire, qui en plus de sa fonction de protéine chaperonne du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe-II, joue un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation cruciales pour la prolifération et la survie cellulaire. Le CD74 démontre une forte affinité pour deux cytokines pro-inflammatoires : le facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF) et son homologue le D-dopachrome tautomerase (DDT). La fixation d'un de ces deux ligands sur le CD74 va initier une cascade de signalisation intracellulaire qui implique soit :

a) <u>la voie « dépendante du CD44/Src »</u>, dans laquelle le CD74 interagit au travers du recrutement et de la phosphorylation d'un co-récepteur : le CD44, qui va conduire à l'activation des protéines Src, MAPK, PI3K/Akt, NF-κB et à la résistance à l'induction d'apoptose par BCL2, BCL-xL et l'altération de l'expression et de l'activité p53 ;



Représentation schématique du rôle joué par la voie CD74 endothéliale

b) <u>la voie « indépendante du CD44 »</u>, dans laquelle des protéases intracellulaires vont cliver un domaine cytosolique du CD74 (fragment CD74-ICD) qui va se transloquer dans le noyau cellulaire et également réguler des gènes cruciaux de prolifération et survie cellulaire (Starlets, Gore et al. 2006; Fan, Hall et al. 2011; Shachar and Haran 2011). Le CD74 peut

également interagir avec les récepteurs AT1 de l'Ang-II et la NOS2. De plus, il a été récemment démontré que le CD74 modulait la synthèse endothélial de l'IL-6, du VEGF et de MCP-1 (Veillat, Carli et al. 2010).

L'ensemble de ces observations soutiennent fortement un rôle clef du CD74 endothélial au carrefour entre la dysfonction endothéliale et l'inflammation et son importance joue un rôle critique dans la pathogenèse de l'HTAP.

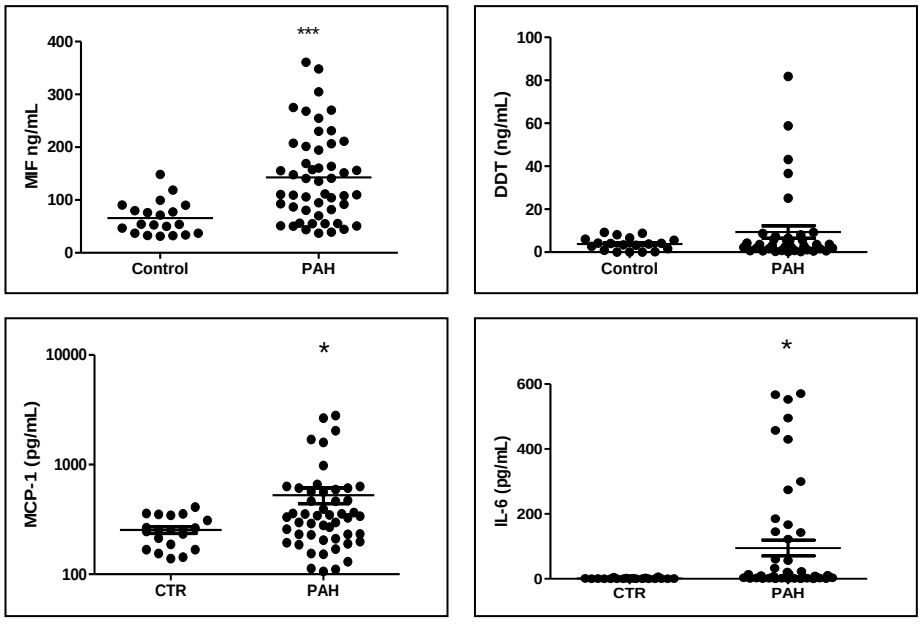
Hypothèse

Par conséquent, nous souhaitons déterminer l'état d'activation de cette voie CD74 endothélial dans l'HP et préciser son importance pour le phénotype anormal des CE-HTAPi : en ce qui concerne la prolifération excessive, la survie et la synthèse de différents facteurs clés inflammatoires (IL-6 et MCP-1).

Principaux résultats

Nos données préliminaires récentes confirment l'importance du CD74 endothélial dans l'HTAP et font parties d'un travail en cours de préparation pour publication :

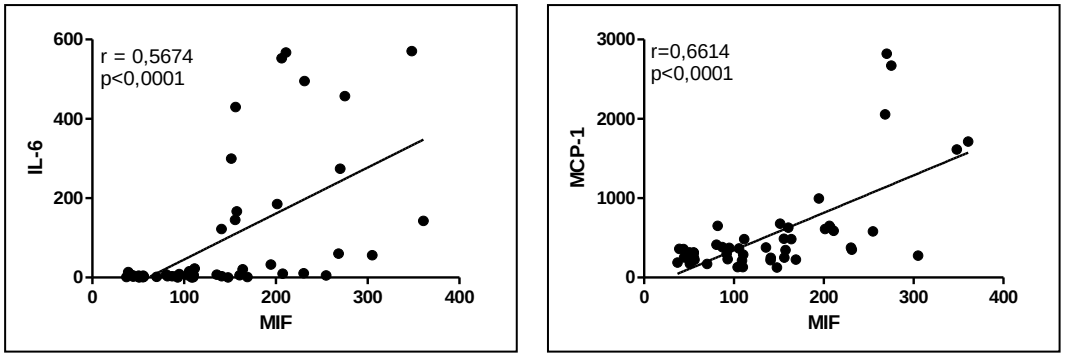
1) *Le ligand MIF est augmenté dans les patients d'HTAPi.*



Niveaux sériques de MIF, DDT, MCP-1 et IL-6 chez des patients HTAPi et contrôles.

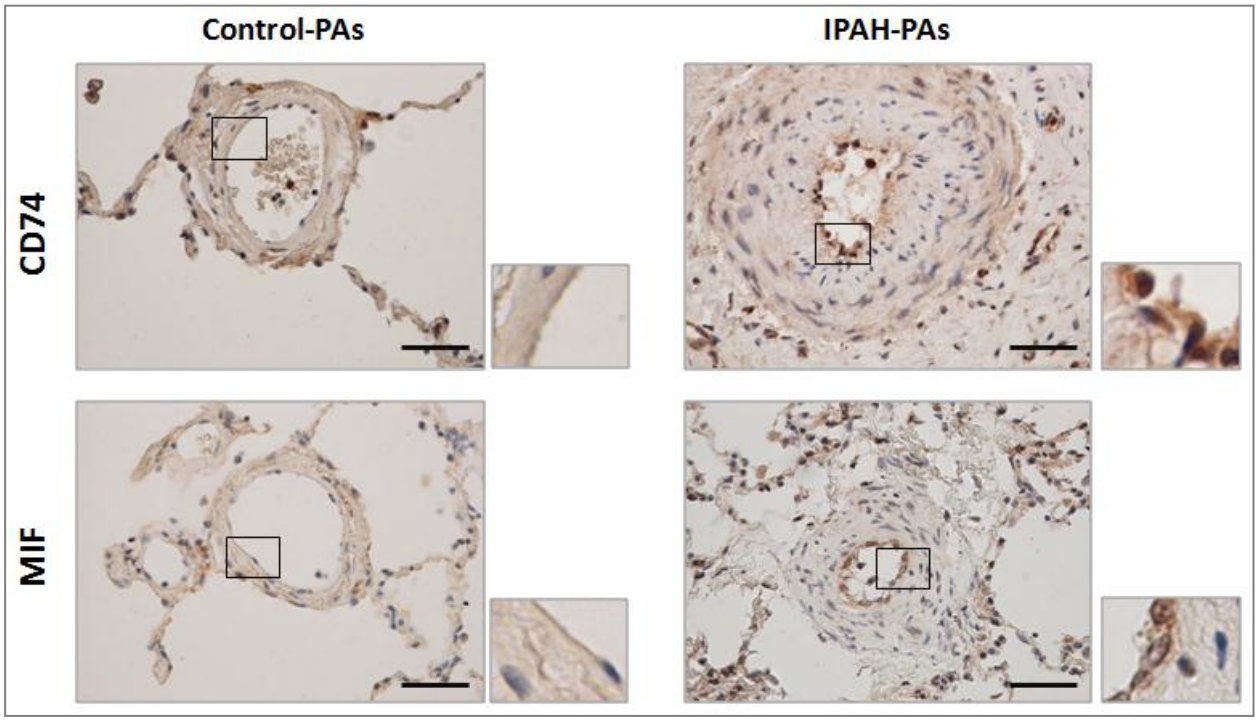
Le taux de MIF sérique est augmenté très significativement dans l'HTAPi tout comme les cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et IL-6. Cependant, le taux sérique de DDT et de CRP est identique aux patients contrôles. Aucune corrélation n'a été trouvée avec la sévérité de la

maladie que se soit avec les valeurs de PAPm, de résistances vasculaires pulmonaires ou d'index cardiaque. En revanche, nous observons une corrélation significative du taux de MIF avec le taux d'IL-6 et de MCP-1 (voir figure ci-dessous). Ces observations sont en accord avec le fait que MIF est une cytokine en amont de la cascade (Veillat, Carli et al. 2010) et nous encouragent à tester l'hypothèse que MIF régule l'expression de ces cytokines par les CE pulmonaire HTAPi.



Corrélations entre les niveaux circulants d'IL-6 et MCP-1 et les niveaux sériques de MIF

2) *CD74 et MIF sont surexprimés dans les tissus pulmonaires de patients HTAPi :*



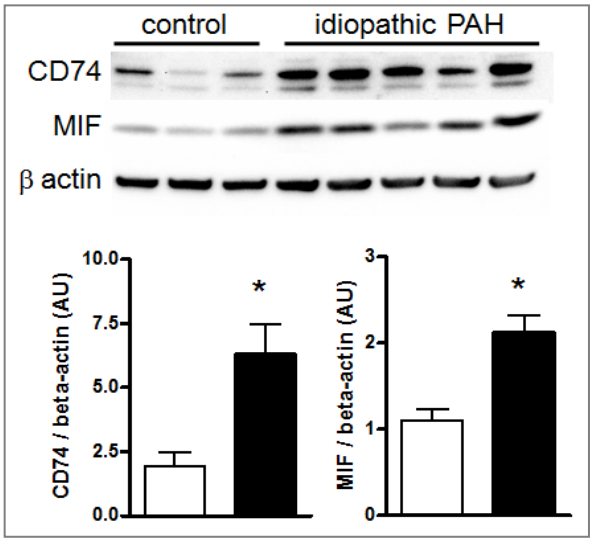
Localisations pulmonaires du CD74 et MIF dans les tissus issus de patients HTAPi et contrôles

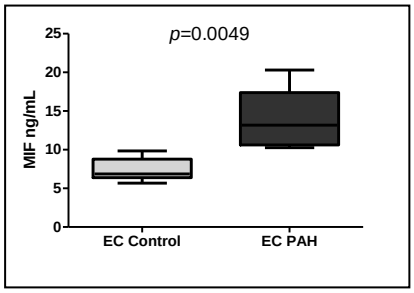
Nous avons pu mettre en évidence une nette surexpression du CD74 et de MIF dans l'endothélium des artères remodelées de patients HTAPi, contrastant fortement avec les

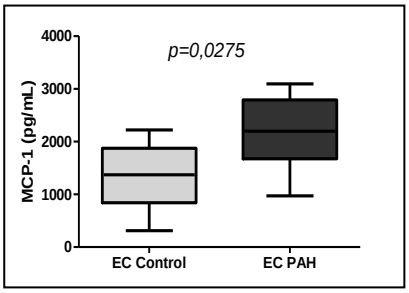
résultats obtenus chez les sujets contrôles. Il est à noter que seule une très faible expression de ces 2 facteurs est présente dans les tissus des patients contrôles.

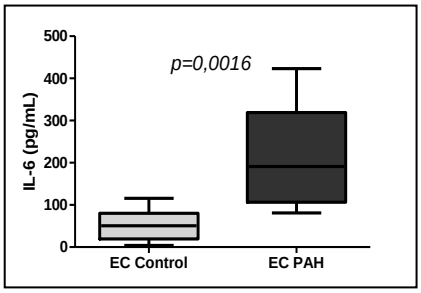
3) *Le CD74 et MIF sont surexprimés par les CE HTAPi humaines en culture :*

Les CE isolées de patients HTAPi, en dehors de tout contexte environnemental, présentent une surexpression du CD74 par rapport aux CE témoins. De manière intéressante, nous avons également pu noter que les CE-HTAPi produisent et relarguent de manière anormale le facteur MIF dans les milieux de culture. De plus, nous avons pu constater que les niveaux de cytokines IL-6 et MCP-1 sont également anormalement élevés dans le surnageant conditionné de CE-HTAPi.





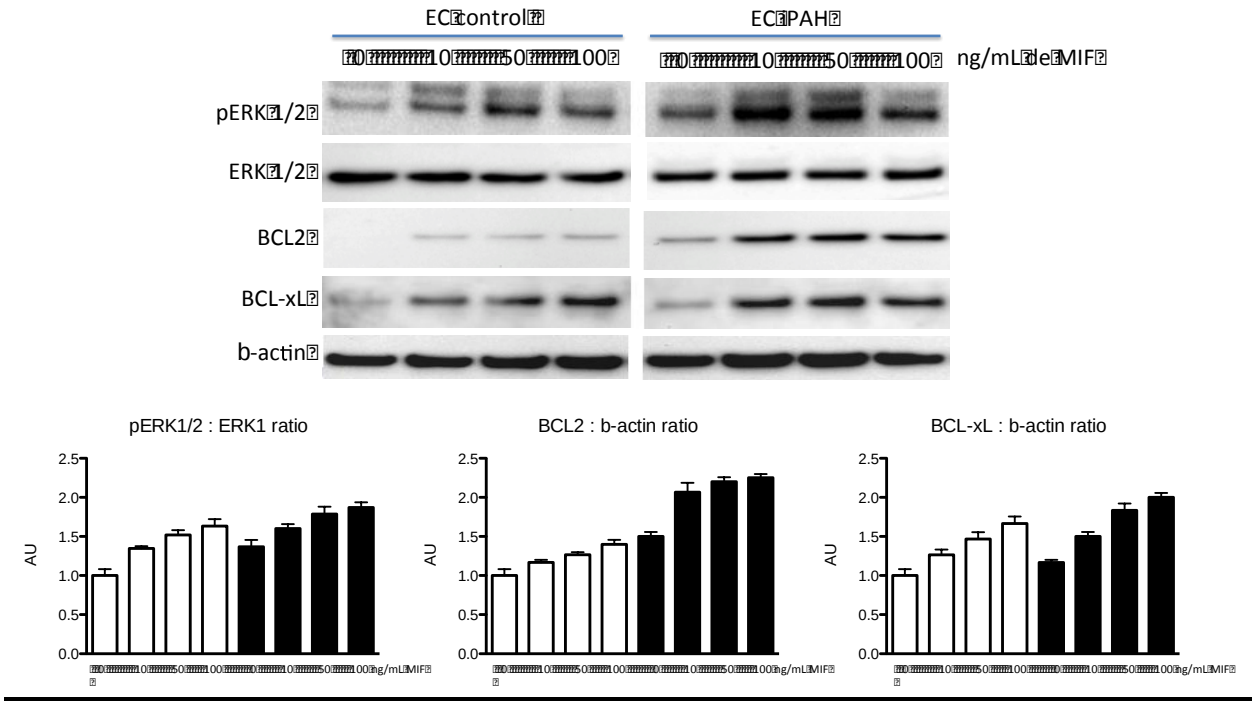




Niveaux d'expression du CD74 par les CE pulmonaires isolées de patients HTAPi et contrôles (panel du haut). Niveaux de MIF, MCP-1 et IL-6 présents dans les surnageants de culture de CE isolées de patients HTAPi et contrôles (panels du bas).

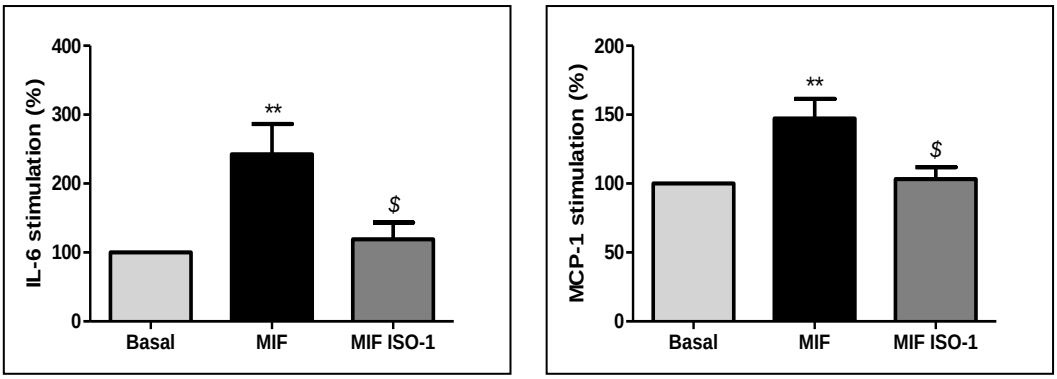
4) *Le facteur MIF active la voie des mitogen-activated protein kinase (MAPK) et induit l'expression de facteurs anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-xL de manière dose-dépendante*

Nous avons pu exposer des CE isolées de patients HTAPi ou contrôles à des doses croissantes de MIF et voir une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 et de l'expression de facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL. Ces données sont en accord avec les résultats de plusieurs autres études et confirment le rôle important de la voie MIF/ CD74 dans la prolifération et la survie cellulaire (Starlets, Gore et al. 2006; Fan, Hall et al. 2011; Shachar and Haran 2011). Il nous reste a préciser la part jouée par la voie MIF/CD74 endothéliale dans le phénotype anormal de la CE HTAPi.



Immunoblots représentatifs de l'évaluation de phopho-ERK1/2, ERK1, BCL2, BCL-xL et β-actine dans les CE pulmonaires isolées de patients HTAPi et contrôles exposées à des doses croissantes de MIF recombinant. Quantifications des ratios phopho-ERK1/2 : ERK1, BCL2 : β-actine et BCL-xL : β-actine.

5) *Le facteur MIF est responsable de la surproduction d'IL-6 et de MCP-1 par les CE pulmonaires humaines en culture*

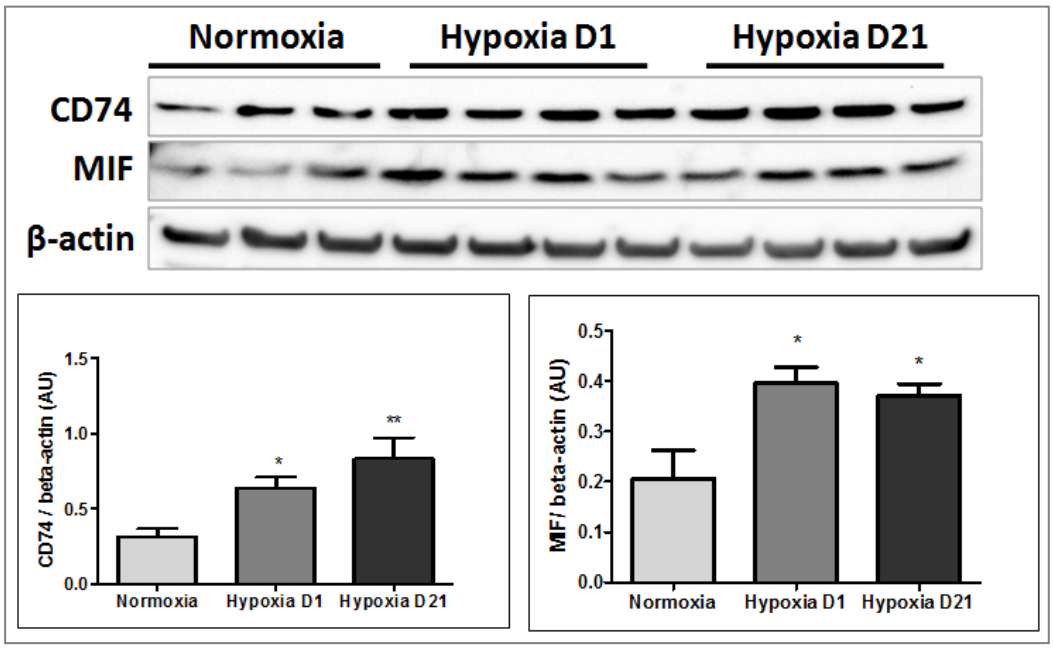


Niveaux de synthèse et relargage d'IL-6 et de MCP-1 par les CE pulmonaires humaines en réponse au facteur MIF en présence ou absence de son antagoniste ISO-1.

Nous avons pu voir que la synthèse et le relargage d'IL-6 et de MCP-1 étaient altérés en présence de doses croissantes de MIF. La synthèse et le relargarge de ces deux cytokines ont pu être réprimées significativement en présence d'un inhibiteur de MIF : ISO-1 (ou (S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole acetic acid, methyl ester). Ces données démontrent clairement que le CD74 endothélial joue également un rôle clé dans le potentiel pro-inflammatoire des CE pulmonaires. Cependant, nous devons confirmer son implication dans

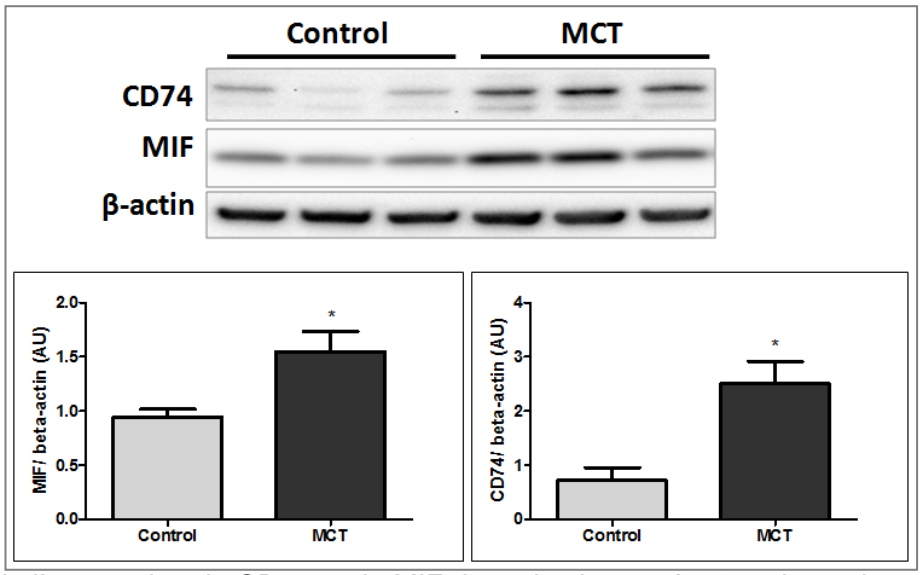
l'HTAP par l'utilisation d'inhibiteurs directs du CD74 : les anticorps neutralisants du CD74 et le siRNA-CD74.

6) *La voie du CD74 endothélial est altérée dans les modèles animaux d'HP :*

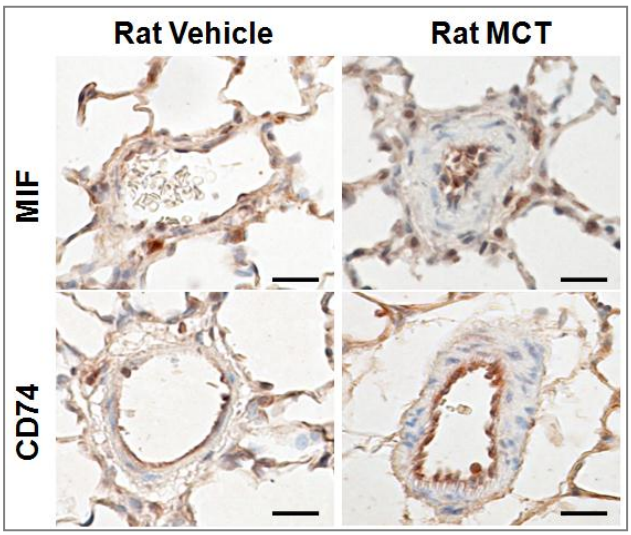


Etude de l'expression du CD74 et de MIF dans des homogénats pulmonaires de souris exposées à 10% d'hypoxie en comparaison à des tissus de souris normoxiques.

Dans le modèle de souris hypoxique, l'expression pulmonaire de MIF et de CD74 est augmentée de façon significative : cette augmentation est visible dès le premier jour d'hypoxie et est maintenue jusqu'au jour 21. Ces données suggèrent que cette voie MIF/ CD74 pourrait jouer un rôle dans les phases précoces du développement de l'HP hypoxique.



Etude de l'expression du CD74 et de MIF dans des homogénats pulmonaires de rats traités à la monocrotaline en comparaison à des tissus de rats contrôles.



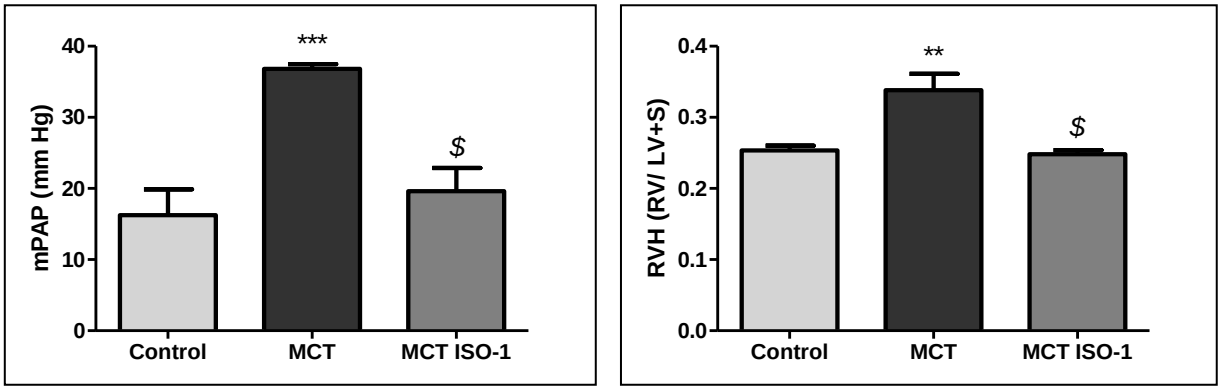
Localisation de l'expression de MIF et de CD74 au niveau d'artères pulmonaires de rats contrôles ou traités à la monocrotaline par immunohistochimie.

L'expression pulmonaire de MIF et de son récepteur CD74 est significativement augmentée au jour 21 dans le groupe où les rats ont reçu une injection de la monocrotaline.

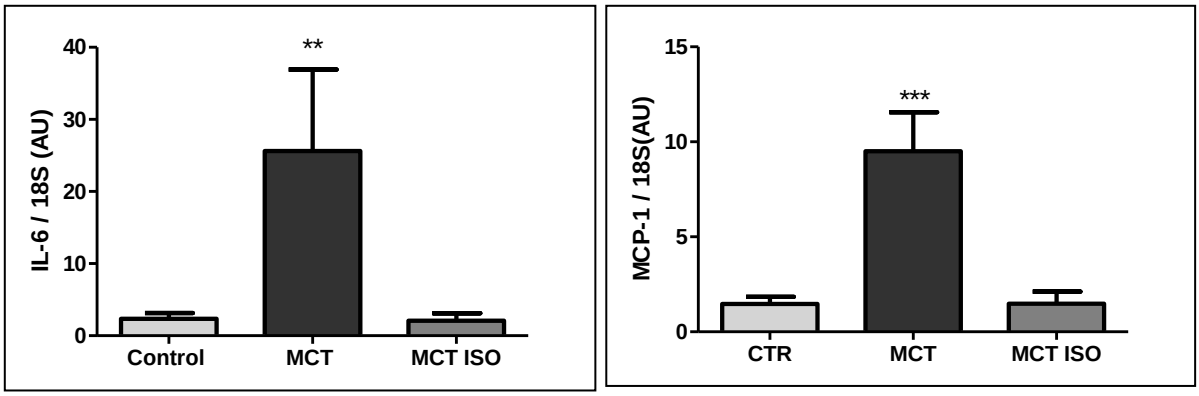
Du fait que MIF est un facteur sécrété et soluble, les dosages sériques sont requis pour les deux modèles animaux testés. Il serait également intéressant de mesurer le taux d'IL-6 et de MCP-1 dans ces modèles animaux. En cohérence avec les données humaines, nous avons pu noter que ces augmentations se localisent également dans l'endothélium des artères pulmonaires remodelées. Ces observations supportent fortement que la voie endothéliale MIF/ CD74 participe au remodelage vasculaire pulmonaire et ainsi au développement de l'HTAP.

7) *L'administration d'ISO-1 chez des rats injectés à la monocrotaline limite l'inflammation*

A la suite de ces travaux *in situ* et *in vitro*, nous avons précisé son importance dans l'HP expérimentale par la détermination de l'efficacité de l'ISO-1 dans le modèle d'administration à la monocrotaline. Nous avons pu voir qu'une administration quotidienne (i.p.) d'ISO-1 à la dose de 30mg/kg/jour pendant une durée de 2 semaines à des rats HTAP (2 semaines après une administration de monocrotaline) protégeait ces animaux contre la progression de la maladie. Des diminutions de la PAPm, et de l'hypertrophie cardiaque ont pu être mesurées. Cette régression phénotypique semble passer par une diminution de l'inflammation via une diminution de médiateurs comme l'IL-6 et de MCP-1. Cependant, ce phénotype de réversion doit être mieux étayé par une analyse de la muscularisation d'artères pulmonaires, des niveaux de cytokines circulantes, de l'infiltration pulmonaire de macrophages.



PAPm et index Fulton de rats contrôles, monocrotaline avec ou sans traitement ISO-1



Mesure de l'expression génique de l'IL-6 et de MCP-1 dans les poumons de rats contrôles, monocrotaline avec ou sans traitement ISO-1

Conclusions

Dans ce travail, nos données préliminaires attestent le rôle important de la voie du CD74 endothéliale dans l'HTAP et notamment pour la synthèse excessive d'IL-6 et de MCP-1 par les CE HTAPi. Nos données montrent que le CD74 est peu exprimé par l'endothélium sain mais fortement par l'endothélium HTAPi. Nous avons pu également montrer que son activité jouait un rôle important dans l'activation de la voie des MAPK, l'expression des facteurs BCL2 et BCL-xL et dans la synthèse et le relargarge d'IL-6 et de MCP-1 au niveau des CE pulmonaires humaines. Quelques données restent encore à être acquises afin de préciser l'effet prolifératif et anti-apoptotique de MIF. Nous devons également évaluer les effets d'inhibiteurs directs du CD74 comme les anticorps neutralisants du CD74 et le siRNA-CD74.

DISCUSSION

Plusieurs évidences antérieures, obtenues dans le laboratoire, ont soulevé de nombreuses questions concernant ce phénotype endothélial anormal dans la physiopathologie de la maladie et ont suggéré un rôle clé de la CE. Premièrement, il a pu être démontré que la CML prolifère lorsqu'elle est en contact avec le milieu des CE pulmonaires et que cela est d'autant plus marqué lorsque les CE sont d'origine de patients ayant une HTAP. Deuxièmement, il a pu être mis en évidence que la CE-HTAP présente des synthèses anormalement élevées de 5-HT, d'ET-1 et de FGF2 qui joue un rôle clé pour l'hyperplasie du muscle lisse. Enfin, il a été démontré qu'une simple altération endothéliale sélective chez la souris, perte du facteur de transcription PPARγ dans les CE, est suffisante pour initier un remodelage artériel pulmonaire et induire un phénotype modéré d'HP. C'est pourquoi dans ce travail de thèse, les objectifs étaient **de préciser et de mieux comprendre le phénotype anormal de la CE pulmonaire de patients HTAP afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques adéquates pour corriger et restaurer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension pulmonaire**. Nous sommes partis du postulat qu'une simple restitution du phénotype aberrant de la CE pulmonaire pouvait limiter la progression et/ou régresser le remodelage artériel pulmonaire associé à l'HP.

Pour commencer ce travail, nous avons débuté par des analyses immunohistologiques de la prolifération et de l'apoptose endothéliale dans les artères pulmonaires HTAPi et contrôle. C'est ainsi que nous avons déterminé que l'endothélium HTAPi présentait environ deux à trois fois plus de CE en prolifération et environ deux fois moins de CE en apoptose que l'endothélium d'artères pulmonaires de patients contrôles. Nous avons pu montrer que ces anomalies étaient parallèlement associées à une surexpression de deux facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL. D'autres études ont pu également mettre en évidence des surexpressions d'autres facteurs anti-apoptotiques dans l'HP comme le facteur survivin (McMurtry, Archer et al. 2005). Par la suite, nous avons isolé et cultivé les CE pulmonaires de patients HTAPi et vu que ces différentes anomalies étaient conservées *in vitro*. Ce maintien *in vitro* de ces caractéristiques d'hyper-prolifération et de résistance à l'apoptose à soulever plusieurs interrogations. Comme il est admis que l'apoptose est un phénomène génétiquement contrôlé mais soumis à des régulations par de nombreux facteurs physiologiques comme les facteurs de croissance et cytokines (Letai and Scorrano 2006), nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène était auto-entretenu par la CE elle-même. En accord avec notre étude précédente (Izikki, Guignabert et al. 2009), nous avons pu déterminer que la CE-HTAPi produisait 5 à 6 fois plus de FGF2 que la CE contrôle (13,3±2,7 versus 2,6±0,9pg/mL respectivement, P<0,001). Nous avons donc émis l'hypothèse que le FGF2 pouvait par son action autocrine être responsable, au moins en partie de ce phénotype endothélial anormal par des boucles autocrines. En effet, le rôle

autocrine du FGF2 sur la CE cancéreuse est connu (Song, Wientjes et al. 2000; Orpana and Salven 2002) et nous avons pu démontrer que le FGF2 induisait de manière dose-dépendante la prolifération et la survie de CE pulmonaire contrôle. Le rôle potentiel du FGF2 dans ce phénotype anormal de la CE-HTAP est d'autant plus amplifié par le fait que le FGF2 est connu pour être stocké en grande quantité dans la MEC. Ainsi, la CE HTAPi qui synthétise beaucoup de FGF2 se retrouve dans un environnement très riche en FGF2, et ceux d'autant plus qu'un important remodelage matriciel existe au cours de la muscularisation et l'oblitération des vaisseaux. De nombreuses protéases sont connues pour libérer le FGF2 de la MEC et le FGF2 est même connu pour induire l'expression de plusieurs protéases dont plusieurs MMPs et le système uPA/plasminogène : collagénase, matrilysine, stromélysine-1, et uPA (Besser, Presta et al. 1995; Kennedy, Rouda et al. 1997; Ribatti, Leali et al. 1999; Pintucci, Yu et al. 2003; Holnthoner, Kerenyi et al. 2006). Nous avons pu montrer que le traitement des CE-HTAPi avec des siRNA-FGF2 restaure presque complètement leur sensibilité à l'apoptose et diminue très fortement leur prolifération cellulaire. Nous avons pu associer ces changements de phénotype fonctionnel à des restitutions de niveaux d'expression de BCL2 et BCL-XL ainsi qu'à une diminution de l'activité de la voie MAPK à des niveaux similaires à ceux retrouvés dans les CE contrôles. Ces données ont ainsi mis en évidence que le FGF2, au moins en partie peut contribuer à l'acquisition et/ou à la maintenance de ce phénotype endothélial anormal dans l'HTAP.

Nous avons également pu noter que les anomalies de la voie du FGF2 ne se limitent pas qu'à des anomalies de surexpression du FGF2, mais aussi à des anomalies d'expression des récepteurs tyrosine kinase FGFR. La CE-HTAPi présente des niveaux d'ARNm et de protéines FGFR2 anormalement élevés. Ce phénomène pourrait expliquer en partie pourquoi la CE-HTAPi répond de manière anormalement élevée au FGF2 pour une même dose de facteur de croissance que la CE-contrôle. C'est pourquoi nous avons entrepris des études pour mieux comprendre la signalisation sous ce récepteur tyrosine kinase avec deux objectifs : 1) localiser plus précisément à quel niveau se situe les anomalies présentes dans cette voie ; 2) identifier une cible dans la voie du FGF2 qui permettent un ciblage plus précis que l'utilisation des inhibiteurs des tyrosines kinases. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à la protéine $p130^{cas}$ qui a fait l'objet du second travail de thèse.

$p130^{cas}$ est une protéine adaptatrice qui intègre et amplifie la signalisation intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance et aux intégrines, facilitant ainsi l'induction de la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Le rôle clé des facteurs de croissance et notamment du PDGF, de l'EGF et du FGF2 sont bien reconnu dans l'HTAP (Merklinger, Jones et al. 2005; Schermuly, Dony et al. 2005; Perros, Montani et al. 2008; Izikki, Guignabert et al.

2009; Dahal, Cornitescu et al. 2010; Tu, Dewachter et al. 2011). Cependant, l'utilisation des outils thérapeutiques disponibles à ce jour contre ces facteurs de croissance, de la famille des inhibiteurs tyrosines kinases (TKI) soulèvent de nombreuses interrogations essentiellement autour de leurs bénéfices/risques. En effet, malgré des résultats très prometteurs de certain TKI dans l'HTAP, comme l'imatinib (Ghofrani, Morrell et al. 2010), des réserves sont émises quant à leur utilisation sur le long court. En effet, plusieurs effets négatifs ont pu être mis en évidence dont une certaine toxicité cardiaque (Kerkela, Grazette et al. 2006). De plus, les mécanismes sous-jacents restent très obscurs. C'est pourquoi une meilleure compréhension de la signalisation sous ces récepteurs est requise.

Sous les récepteurs de type tyrosine kinase (PDGF, EGF et FGF2) et sous la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), qui est particulièrement importante dans la transmission du signal relayé par les intégrines, on retrouve la protéine $p130^{cas}$. Il s'agit d'une protéine adaptatrice composée d'un : **1)** domaine N-terminal de type SH3 ; **2)** domaine central dit "*substrate domain*" qui consiste en la répétition de multiple domaines de liaison SH2 (Tyr-x-x-Pro) ; **3)** domaine C-terminal comprenant un site dit "*Src-binding domain*" (Sakai, Iwamatsu et al. 1994; Defilippi, Di Stefano et al. 2006). Il est clairement admis que la protéine $p130^{cas}$ est essentiellement phosphorylée par les protéines Src et FAK (Ruest, Shin et al. 2001). Nos données ont pu révéler que $p130^{cas}$ est fortement abondante dans les parois des artères pulmonaires, surtout au niveau du muscle lisse et de l'endothélium. Bien que les origines restent très obscures, la présence sérique de $p130^{cas}$ a été décrite chez des patients atteints de cancers du poumon à non-petites cellules et des patients atteints de tuberculose (Deng, Huang et al. 2011). C'est pourquoi nous l'avons également évalué au niveau sérique et retrouvé aussi une forte augmentation de sa présence sérique dans les sérums de patients HTAPi par rapport aux témoins. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette surabondance comme par exemple des débris cellulaires ou des microparticules circulantes. Enfin, nous avons pu mettre également en évidence que ces anomalies de surexpression de $p130^{cas}$ persistent *in vitro* dans des cultures de CE pulmonaires et CML-AP.

La surexpression/suractivité de $p130^{cas}$ peut participer à de multiples niveaux au remodelage artériel pulmonaire. En effet, $p130^{cas}$ est surexprimé dans de nombreux cancers et participe à la prolifération anormale de ces cellules ainsi qu'à leur transformation par plusieurs oncogènes comme Src, l'ERBB2 (ou HER2), *l'Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK) (Pylayeva, Gillen et al. 2009; Cabodi, Tinnirello et al. 2010). Il est également reconnu que $p130^{cas}$ confère des résistances aux drogues anticancéreuses comme à la doxorubicine ou au tamoxifène par l'activation des voies Src, EGFR, AKT et ERK (van der Flier, Brinkman et al. 2000; Ta, Thomas et al. 2008). Or, nous savons que Src est abondant dans la vasculature et qu'il est suractivé

dans l'HTAP (Oda, Renaux et al. 1999; Courboulin, Paulin et al. 2011). Nous avons pu démontrer que l'utilisation de siRNA-p130^{cas} peut non seulement diminuer la prolifération basale mais aussi la prolifération induite par le PDGF, l'EGF et le FGF2 dans les CE-HTAPi et CML-HTAPi. p130^{cas} est aussi connu pour son rôle dans la migration cellulaire. En effet, les fibroblastes embryonnaires déficients en p130^{cas} (souris KO p130^{cas}) sont incapables de migrer sauf si p130^{cas} est ré-exprimé. En revanche, si la réexpression d'une protéine p130^{cas} défectueuse dans le domaine "*substrate domain*" ne restaure pas la fonction migratoire des fibroblastes embryonnaires déficients en p130^{cas} (Honda, Oda et al. 1998; Shin, Dise et al. 2004). Nous avons pu constater que le siRNA-p130^{cas} diminue la migration exagérée basale et la migration induite par le PDGF dans les CE-HTAPi et CML-HTAPi. Nos données obtenues, aussi bien avec la prolifération qu'avec la migration, supportent que le p130^{cas} permet d'amplifier la signalisation de ces facteurs de croissance. Nous avons pu valider cette dernière hypothèse par le suivi de la phosphorylation des MAPK. En effet, l'exposition de CML au PDGF, à l'EGF et au FGF2 stimule en 15min la phosphorylation de ERK1/2. Cependant si l'on retire p130^{cas}, cet effet est beaucoup moins marqué. Les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 en réponse aux différents facteurs restent néanmoins plus forts qu'à l'état basal, ce qui soutient le fait que p130^{cas} n'est pas nécessaire à leur signalisation mais participe plutôt à leur amplification. C'est pourquoi, nous pensons que p130^{cas} représente une bonne cible pour inhiber les signalisations provenant des récepteurs RTK ou des intégrines.

Tout comme le SU5402 (inhibiteur du FGF2) ou les siRNA-FGF2 (Izikki, Guignabert et al. 2009), nous avons également pu valider l'efficacité d'un nouvel inhibiteur du FGF2 (valider pour un usage chez l'homme) le dovitinib dans le modèle d'HP induit à la monocrotaline. Cet inhibiteur administré chroniquement à des rats injectés à la monocrotaline diminue : **1)** les paramètres hémodynamiques, l'hypertrophie cardiaque, la muscularisation des artères pulmonaires ; **2)** l'activité p130^{cas} et l'activité MAPK. Des résultats identiques ont pu être obtenus avec un inhibiteur de l'EGF (le gefitinib) et un inhibiteur du PDGF (l'imatinib). Ces données valident nos observations précédentes, cependant l'absence d'inhibiteur sélectif de p130^{cas} limite notre démonstration, mais devrait encourager la création d'une telle molécule.

De manière très intéressante, p130^{cas} est un modulateur négatif de la voie du TGF-β par liaison avec la protéine smad3 et que la surexpression de p130^{cas} dans des cellules épithéliales mammaires « shift » la voie smad2/3 vers l'activation de la voie p38 (Kim, Seok Kang et al. 2008; Wendt, Smith et al. 2009). Puisqu'un shift identique de la voie smad1/5/8 est également retrouvé dans les cellules vasculaires pulmonaires en présence d'une mutation BMPR-II, il serait très intéressant d'explorer les liens éventuels de p130^{cas} avec cette voie de signalisation centrale pour l'hypertension pulmonaire.

D'autre voie de signalisation peuvent contribuer à la prolifération et migration excessive et survie des CE et c'est dans ce contexte que nous avons voulu explorer le rôle du CD74. L'intérêt porté à cette voie s'explique par les éléments suivants. Le CD74 est normalement peu exprimé dans les tissus et son expression est limité aux cellules B, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et épithéliales (Badve, Deshpande et al. 2002). Une étude récente de McClelland *et al.* (McClelland, Zhao et al. 2009) a clairement montré que l'expression de CD74 pulmonaire était limitée essentiellement aux macrophages alvéolaires. En revanche, MIF est constitutivement exprimé par plusieurs types cellulaires et de forts taux sériques et urinaires peuvent être retrouvés. Les monocytes et macrophages expriment fortement MIF qu'ils libèrent en grande quantité lors de leur exposition à différentes toxines bactériennes et cytokines. En cohérence avec ces données, nous avons retrouvé des marquages immunohistologiques de CD74 et MIF très faibles dans les poumons sains, contrastant fortement avec les tissus pulmonaires HTAPi. Ces constations révèlent donc que la voie MIF/CD74 et DDT/CD74 peut représenter une cible thérapeutique de choix dans l'HTAP. De plus, nous avons pu obtenir des données montrant que les CE-HTAPi gardent des fortes expressions de CD74 et de MIF *in vitro*, ce qui amplifie l'intérêt que l'on peut porter à cette voie dans la maladie.

Des travaux ont également montré que le blocage de MIF durant les étapes précoces de la cancérisation inhibait la prolifération des CE et réduisait la taille de la tumeur (Chesney, Metz et al. 1999). Ce qui suggère que MIF agit comme un facteur de croissance et peut promouvoir la cancérisation et servir de cible anticancéreuse. De plus, il est établi que CD74 peut servir de marqueur dans la progression cancéreuse (Young, Amin et al. 2001; Meyer-Siegler, Iczkowski et al. 2005; Meyer-Siegler, Iczkowski et al. 2006; Verjans, Noetzel et al. 2009). Ainsi, ces données, associées à nos observations que l'activité de la voie CD74 endothéliale peut promouvoir la prolifération et la survie de CE pulmonaires contrôles, laissent suggérer que le CD74 pourrait être à l'origine de phénotype endothélial anormal HTAP, ou au moins expliquer sa maintenance. En accord avec cette hypothèse, des études récentes ont montré des liens étroits entre CD74 et p53 ainsi que CD74 et HIF (Hudson, Shoaibi et al. 1999; Lantner, Starlets et al. 2007; Oda, Oda et al. 2008).

MIF est également connu pour être stimulé par divers stimuli comprenant, entre autres : le stress oxydant, les endotoxines, des médiateurs inflammatoires et immuns. Or MIF est connu pour être un médiateur très précoce de l'inflammation et pouvant induire l'expression de TNFα, de l'IL-1, d'IL-6, d'IL-8, de l'interféron (IFN)γ. Il représente d'ailleurs une cible thérapeutique potentielle pour diverses maladies inflammatoires, infectieuses et autoimmunes. Nos données confirment également que son inhibition à l'aide d'ISO-1 est efficace contre le développement de l'HP induite par la monocrotaline. Récemment, le DDT (*D-stereoisomer of dopachrome* ou

MIF2) a été identifié comme étant un second ligand du CD74 (Merk, Zierow et al. 2011) capable d'induire une signalisation identique à celle de MIF/CD74 mais cependant le taux sérique de DDT est inchangé. Seul le taux sérique de MIF est augmenté très significativement dans le sérum de patients HTAP et renforce l'importance des défauts endothéliaux de CD74 dans la pathologie.

L'ensemble de nos données suggère fortement que ce récepteur CD74 et son ligand MIF pourraient être des acteurs clés à l'interface entre l'inflammation et la dysfonction endothéliale. Le fait que des effets bénéfiques de l'inhibition de cette voie a pu être constaté dans des modèles animaux d'asthme, d'infections sévères et de cancers renforcent l'intérêt de son évaluation dans l'HTAP. Les mécanismes sous-jacents et la démonstration que cette voie peut être cibler dans l'HTAP serait des avancées importantes dans notre compréhension de la maladie. Nous ne savons pas non plus si des liens existent entre la voie du CD74 et les facteurs de croissance.

Pour résumer, dans ces travaux de thèse menés sur les CE HTAP ont ainsi pu permettre :

A- de quantifier les potentiels prolifératifs et migratoires, de quantifier les niveaux de sensibilité à différents facteurs antiapoptiques (sevrage en sérum, cycloheximide, H_2O_2), de quantifier leurs réponses à différents récepteurs tyrosine kinase (PDGF-R, EGF-R, FGF-R), de quantifier leurs productions et libérations de FGF2, de MMP2, de MIF, d'IL-6 et de MCP-1. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence plusieurs anomalies intrinsèques : boucle autocrine de FGF2, activité constitutive de la MAPK, surexpression de facteurs antiapoptotiques BCL2 et BCL-xL, de FGFR-2, de $p130^{cas}$ et de CD74.

B- d'identifier plusieurs cibles potentiellement impliqués dans ce phénotype endothélial anormal comme : **1)** la surexpression/suractivité des récepteurs tyrosine kinase FGFR, **2)** la surexpression de facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL, **3)** la présence d'une activité constitutive de MAPK, **4)** la surabondance de MIF, **5)** la surexpression/suractivité de CD74.

Plusieurs outils visant l'une de ces cibles identifiées sont disponibles actuellement, dont certains sont utilisées dans d'autres pathologies ou sont en cours d'évaluation pour d'autres maladies. Nous retrouvons bien sûr les inhibiteurs des tyrosine kinase (TKI) dont le dovitinib qui a permi d'obtenir des résultats très encourageants dans notre étude. De même des inhibiteurs ciblant les BCL2 et/ ou BCL-xL existent (Kang and Reynolds 2009) : parmi d'autre l'oblimersem, l'AT-101, l'apogossypol, l'ABT-737, le GX15-070, l'HA14-1. De même plusieurs molécules anti MAPK, des anticorps anti-CD74 humanisés (milatuzumab) sont en cours de développement.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'HTAP est une maladie grave, à évolution rapide et fatale à prédominance féminine (1 homme pour 2 femmes) et touchant principalement le jeune adulte, même si tous les âges peuvent être touchés. C'est une maladie qui touche les petites artères pulmonaires, provoquant une augmentation progressive de la PAPm au delà de 25 mmHg au repos, pour une normale entre 14±3 mmHg. Aucun traitement curatif n'est disponible actuellement en dehors de la transplantation cardio-pulmonaire. Le taux de survie des patients HTAP est sombre après son diagnostic. C'est une pathologie qui évolue très vite, devenant invalidante et qui fini par être fatale.

Au cours de ce doctorat, j'ai pu étudier le phénotype anormal de CE-HTAPi et mettre en évidence plusieurs perturbations fonctionnelles liées à des anomalies moléculaires. Les CE HTAPi se caractérise par une prolifération, une migration, une survie et une réponse excessive à différents facteurs de croissance : PDGF, EGF, et FGF2. Plusieurs anomalies moléculaires sont à l'origine de ces perturbations fonctionnelles, dont notamment une production et libération anormale de FGF2, de MMP2, de MIF, d'IL-6 et de MCP-1, mais aussi une activité constitutive de la MAPK, une surexpression des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL, de FGFR-2, de $p130^{cas}$ et de CD74.

Ces travaux ouvrent de nouvelles opportunités d'investigation translationnelle et soulèvent aussi un certain nombre de questions : Comment la CE pulmonaire acquiert-elle ce phénotype anormal ? Comment ce phénotype endothélial aberrant est-t-il maintenu et transmis aux cellules adjacentes et cellules filles ? Est-ce que ce phénotype anormal est réversible à tout moment de la progression de la maladie ? Quelle est la séquence précise de mise en place de toutes ces anomalies moléculaires ? Quels sont les facteurs prédisposants ? Pourquoi ces perturbations n'affectent que la petite circulation pulmonaire ?

AUTRES PROJETS COLLABORATIFS MENES EN PARALLELE DE CES TRAVAUX DE DOCTORAT

Dysregulated Renin-Angiotensin-Aldosteron System 1 Contributes to Pulmonary Arterial Hypertension

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CRITICAL CARE MEDECINE

-Sous Révision-

Frances S. de Man, Ly Tu, M. Louis Handoko, Silvia Rain, Gerrina Ruiter, Charlène François, Ingrid Schalij, Peter Dorfmüller, Gérald Simonneau, Elie Fadel, Anco Boonstra, Piet E. Postm, Jolanda van der Velden, Anton Vonk-Noordegraaf, Marc Humbert, Saadia Eddahibi, Christophe Guignabert

Introduction

Le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA ou RAAS) est un système hormonal qui joue un rôle de tout premier plan dans la régulation de la pression artérielle (PA) et le contrôle de la balance hydrosodée. L'angiotensine II (Ang-II) et l'aldostérone, les deux hormones de ce système, combinent leurs effets à court, moyen, et long terme sur leurs principaux organes cibles : les vaisseaux, le cœur, le rein et le cerveau. Ces actions sont responsables d'une vasoconstriction, d'une rétention hydrosodée, mais aussi de modifications structurales de ces organes.

L'angiotensinogène, protéine inactive produite par le foie, circule dans le sang. C'est le précurseur des peptides actifs Ang-I et Ang-II, et le seul substrat de la rénine. L'angiotensinogène est clivé par la rénine et forme un décapeptide appelé Ang-I, inactif. L'Ang-I sera ensuite principalement transformée en Ang-II par une carboxypeptidase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, ou ACE). Cette enzyme est essentiellement secrétée au niveau pulmonaire. L'angiotensine agit en se fixant sur ses récepteurs transmembranaires. Il existe deux types de récepteurs, AT1 (majoritaire) et AT2, qui ont des rôles antagonistes. AT2 est responsable de la vasodilatation, l'inhibition de croissance cellulaire et l'apoptose. AT1 favorise l'élévation de la pression artérielle par différents mécanismes et stimule la vasoconstriction des artérioles ainsi que l'hyperplasie et l'hypertrophie vasculaire.

Hypothèse

Par conséquent, nous avons évalué le système RAAS dans l'HTAP et testé les effets de son inhibition au niveau de l'AT1 dans les modèles animaux d'HP induite par la monocrotaline.

Principaux Résultats et Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que les niveaux de rénine, d'Ang-I et d'Ang-II sont associés à la progression de la maladie ainsi qu'à la survie des patients. Nous avons également pu mettre en évidence que les CE-HTAP possèdaient des activités ACE plus élevées que les CE-contrôles. De plus, une surexpression et suractivité du récepteur AT1 a pu être mise en évidence à la surface des CML-AP d'HTAPi par rapport aux CML-AP contrôles. Enfin, nous avons pu démontrer que le blocage du système RAAS au niveau de l'AT1 par le losartan offrait un effet bénéfique sur la progression de la maladie induite par la monocrotaline. Cette stratégie d'inhibition au niveau de l'AT1 nous semble plus efficace qu'un blocage au niveau de l'ACE, permettant de priviligier l'activation bénéfique de l'AT2.

Conclusion

Nous montrons clairement des défauts d'activation systémique et locale (au niveau des parois des artères pulmoanires) du système RAAS dans l'HTAPi et démontrons l'effet bénéfique de son blocage chronique par le losartan

Dysregulated Renin-Angiotensin-Aldosteron System Contributes to Pulmonary Arterial Hypertension

Frances S. de Man[1,2], Ly Tu[1], M. Louis Handoko[2,3], Silvia Rain[2], Gerrina Ruiter[2], Charlène François[1], Ingrid Schalij[2], Peter Dorfmüller[1], Gérald Simonneau[1], Elie Fadel[1], Anco Boonstra[2], Piet E. Postmus, [2], Jolanda van der Velden[3], Anton Vonk-Noordegraaf[2], Marc Humbert[1], Saadia Eddahibi[1], Christophe Guignabert[1]

[1]INSERM U999, Le Plessis-Robinson, France; [2]Department of Pulmonology and [3]Physiology, VU University Medical Center / Institute of Cardiovascular Research, Amsterdam, The Netherlands

CORRESPONDING AUTHOR

Frances S. de Man, PhD; VU University Medical Center; Department of Pulmonology; De Boelelaan 1117; 1081 HV Amsterdam; The Netherlands; Tel: +31 20 44 44782; Fax: +31 20 44 44328; Email: fs.deman@vumc.nl

AUTHORS CONTRIBUTION

FSdM, LT, MLH, AVN, MH, SE and CG contributed to conception and design of the present study. FSdM, LT, SR, GR, CF, IS, PD, GS, EF, AB and CG contributed to the acquisition of data. FSdM, LT, MLH, PEP, JvdV, AVN, MH, SE and CG contributed to analysis or interpretation of the data. FSdM, LT, MLH, and CG drafted the manuscript, and SR, GR, CF, IS, PD, GS, EF, AB, PEP, JvdV, AVN, MH, and SE subsequently revised the article critically for intellectual content. All authors gave their final approval of this version of the manuscript to be published.

SOURCES OF SUPPORT

Dr. Frances S. de Man is the recipient of a European Respiratory Society /Marie Curie Joint Research Fellowship - Number MC 1120-2009. The research leading to these results has received funding from the European Respiratory Society and the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 - Marie Curie Actions under grant agreement RESPIRE, PCOFUND-GA-2008-229571.

AJRCCM 2012

For Review Only

ABSTRACT

Rationale – Patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) often have a low cardiac output. To compensate, neurohormonal systems like renin-angiotensin-aldosteron system (RAAS) and sympathetic nervous system could be upregulated and may have long-term negative effects on the progression of PAH.

Objectives – Assess systemic and pulmonary RAAS-activity in iPAH-patients and determine the efficacy of chronic RAAS-inhibition in experimental PAH.

Measurements and Main Results – We collected 79 blood samples from 58 iPAH-patients in the VU University Medical Center Amsterdam (between 2004-2010), to determine systemic RAAS-activity. We observed increased levels of renin, angiotensin (Ang) I and AngII, which was associated with disease progression ($p<0.05$) and mortality ($p<0.05$). To determine pulmonary RAAS-activity, lung specimens were obtained from iPAH-patients (during lung transplantation, n=13) and controls (during lobectomy or pneumonectomy for cancer, n=14). RAAS-activity in pulmonary arteries of iPAH-patients was increased, demonstrated by elevated ACE-activity in pulmonary endothelial cells and increased AngII type 1 (AT_1) receptor expression and signalling. In addition, local RAAS-upregulation was associated with increased pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via enhanced AT_1-receptor signalling in iPAH-patients compared to controls. Finally, to determine the therapeutic potential of RAAS-activity, we assessed the chronic effects of a AT_1-receptor antagonist (losartan) in the monocrotaline PAH-rat model (60 mg/kg). Losartan delayed disease progression, decreased RV afterload and pulmonary vascular remodeling and restored right ventricular-arterial coupling in PAH-rats.

Conclusions – Systemic and pulmonary RAAS-activities are increased in iPAH-patients and associated with increased pulmonary vascular remodeling. Chronic inhibition of RAAS by losartan is beneficial in experimental PAH.

WORDS: 246

For Review Only

Leptin And Regulatory T Lymphocytes In Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension

Eur Respir J. 2012 – en presse

Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girerd B, Perros F, Montani D, Fabre D, Fadel E, Eddahibi S, Cohen-Kaminsky S, Guignabert C, Humbert M.

Introduction

La leptine est une protéine de 16kDa et qui a été isolée pour la toute première fois en 1994 par Zhang *et al.* (Zhang, Proenca et al. 1994). C'est une adipokine principalement produite par le tissu adipeux. Une corrélation positive entre le taux circulants de leptine et la quantité totale de tissu graisseux dans l'organisme existe. En effet, la leptinémie est plus élevée chez des individus obèses que chez les individus minces (Considine, Sinha et al. 1996). La leptine induit ses effets en se liant à son récepteur, présent en plusieurs isoformes et résultant d'un épissage alternatif du gène Ob-R. Les deux principales isoformes, Ob-Ra et Ob-Rb, sont exprimées de manière ubiquitaire chez l'homme et la souris (Hoggard, Mercer et al. 1997; Maccio, Madeddu et al. 2009). La synthèse de leptine augmente en réponse aux infections aigues et à la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1, le TNFα et le LIF (*Leukemia inhibitory factor*) (Otero, Lago et al. 2005). La sécrétion de leptine est par ailleurs inhibée par la testostérone alors qu'elle est augmentée par les hormones stéroïdiennes féminines.

La leptine est capable d'intervenir à de nombreux niveaux. D'une part, elle est reconnue comme étant capable de stimuler la croissance de nombreuses lignées cellulaires et aussi la prolifération de CE, mais aussi d'inhiber leur apoptose (Artwohl, Roden et al. 2002). De plus, la leptine stimule la migration des CE et l'angiogenèse (Park, Kwon et al. 2001; Goetze, Bungenstock et al. 2002) et de stimuler le stress oxydant lorsqu'elle est placée sur des cultures de CE (Bouloumie, Marumo et al. 1999). Une altération des réponses immunitaires et une susceptibilité aux infections ont été rapportées chez les animaux déficients en leptine ou en son récepteur, chez les sujets déficients en leptine ainsi que lors des situations de malnutrition, où l'on observe des taux faibles de leptine. Enfin, la leptine joue également un rôle central sur la réponse immunitaire adaptative, essentiellement via son action sur les lymphocytes T CD4+. En effet, la leptine module : **1)** la génération, la maturation et la survie des thymocytes, en retardant

leur entrée en apoptose ; **2)** la prolifération et l'activation lymphocytaire T (La Cava, Alviggi et al. 2004; La Cava and Matarese 2004; Matarese, Carrieri et al. 2005; Matarese, Moschos et al. 2005) ; **3)** la production d'hormone de croissance par les lymphocytes, par des mécanismes dépendants de la protéine kinase C et du NO (Dixit, Mielenz et al. 2003).

Hypothèse de ce travail

Dans ce travail, nous avons émis l'hypothèse que la synthèse anormale de leptine par l'endothélium dysfonctionnel pouvait influencer la fonction des lymphocytes T régulateur.

Principaux résultats obtenus

Nous avons pu mettre en évidence que les patients HTAPi présentent des taux circulants de leptine anormalement élevés qui impactent la fonction des lymphocytes T régulateur. La CE-HTAPi fait partie des sources participant à l'augmentation de leptine chez les patients HTAPi. De plus, nous avons pu mettre en évidence que bien que le nombre de lymphocytes T régulateur est identique entre patients contrôles et HTAPi, leur fonction est fortement diminuée. L'évaluation de leur fonctionnalité a pu être réalisée par mesure de l'activité STAT3 qui se retrouve de manière dose-dépendante touchée par la leptine. Des études plus poussées sont actuellement en cours pour non seulement déterminer les mécanismes impliqués dans cette anomalie, mais aussi pour préciser l'importance de ce phénomène dans la communication CE/cellules immunitaires.

***ERJ Express*. Published on February 23, 2012 as doi: 10.1183/09031936.00159911**

Leptin and regulatory T lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension

Alice Huertas[1,2,3], Ly Tu[1,2,3], Natalia Gambaryan[1,2,3], Barbara Girerd[1,2,3], Frédéric Perros[1,2,3], David Montani[1,2,3], Dominique Fabre[1,2,3], Elie Fadel[1,2,3], Saadia Eddahibi[1,2,3], Sylvia Cohen-Kaminsky[1,2,3], Christophe Guignabert[1,2,3], Marc Humbert[1,2,3]

[1] *Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Kremlin-Bicêtre, F-94276;*

[2] *Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Béclère, AP-HP, Clamart, F-92140;*

[3] *INSERM U999 Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, LabEX LERMIT Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, F-92350*

Corresponding author:

Prof. Marc Humbert

Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Hôpital Antoine Béclère, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris-Sud 11

157, rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, France

Tel: +33 1 45 37 47 72, Fax: +33 1 46 30 38 24

marc.humbert@abc.aphp.fr

Abstract

Copyright 2012 by the European Respiratory Society.

Immune mechanisms and autoimmunity seem to play a significant role in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) genesis and/or progression but the pathophysiology is still unclear. Recent evidence has demonstrated a detrimental involvement of leptin in promoting various autoimmune diseases by controlling regulatory T lymphocytes. Despite this knowledge, the role of leptin in IPAH is currently unknown. We hypothesized that leptin, synthesized by dysfunctional pulmonary endothelium, might play a role in the immunopathogenesis of IPAH by regulating circulating regulatory T lymphocytes function. First, we collected serum and regulatory T lymphocytes from controls, IPAH and scleroderma-associated (SSc-PAH) patients; secondly, we recovered tissue samples and cultured endothelial cells after surgery or transplantation in controls and IPAH patients, respectively. Our findings indicate that serum leptin was higher in IPAH and SSc-PAH patients compared to controls. Circulating regulatory T lymphocytes number was comparable in all groups, the percentage of those expressing leptin receptor was higher in IPAH and SSc-PAH compared to controls, whereas their function was reduced in IPAH and SSc-PAH patients compared to controls in a leptin-dependent manner. Furthermore, endothelial cells from IPAH patients synthesized more leptin than controls. Our data suggest that endothelial-derived leptin may play a role in the immunopathogenesis of IPAH.

Key words: dysimmunity, endothelial dysfunction, leptin, pulmonary arterial hypertension, regulatory T lymphocytes

Introduction

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdalla, S. A., C. J. Gallione, et al. (2004). "Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia." Eur Respir J **23**(3): 373-377.

Abe, Y., K. Tatsumi, et al. (2001). "Effects of inhaled prostacyclin analogue on chronic hypoxic pulmonary hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **37**(3): 239-251.

Abenhaim, L., Y. Moride, et al. (1996). "Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group." N Engl J Med **335**(9): 609-616.

Abraham, W. T., M. V. Raynolds, et al. (2003). "Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with primary pulmonary hypertension: increased frequency and association with preserved haemodynamics." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **4**(1): 27-30.

Akira, S., T. Taga, et al. (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol **54**: 1-78.

Alastalo, T. P., M. Li, et al. (2011). "Disruption of PPARgamma/beta-catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival." J Clin Invest **121**(9): 3735-3746.

Aldred, M. A., S. A. Comhair, et al. (2010). "Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **182**(9): 1153-1160.

Archer, S. L., M. Gomberg-Maitland, et al. (2008). "Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H570-578.

Archer, S. L., J. M. Huang, et al. (1996). "Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia." Circ Res **78**(3): 431-442.

Arcot, S. S., J. A. Fagerland, et al. (1995). "Basic fibroblast growth factor alterations during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Growth Factors **12**(2): 121-130.

Armulik, A., A. Abramsson, et al. (2005). "Endothelial/pericyte interactions." Circ Res **97**(6): 512-523.

Artwohl, M., M. Roden, et al. (2002). "Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(4): 577-580.

Atkinson, C., S. Stewart, et al. (2002). "Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor." Circulation **105**(14): 1672-1678.

Austin, E. D., J. D. Cogan, et al. (2009). "Alterations in oestrogen metabolism: implications for higher penetrance of familial pulmonary arterial hypertension in females." Eur Respir J **34**(5): 1093-1099.

Austin, E. D., L. Ma, et al. (2012). "Whole Exome Sequencing to Identify a Novel Gene (Caveolin-1) Associated with Human Pulmonary Arterial Hypertension." Circ Cardiovasc Genet.

B, C. P., X. A. M, et al. (2011). "Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials." Curr Cancer Drug Targets **11**(3): 254-284.

Baber, S. R., W. Deng, et al. (2007). "Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1120-1128.

Badve, S., C. Deshpande, et al. (2002). "Expression of invariant chain (CD 74) and major histocompatibility complex (MHC) class II antigens in the human fetus." J Histochem Cytochem **50**(4): 473-482.

Balabanian, K., A. Foussat, et al. (2002). "CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **165**(10): 1419-1425.

Balasubramaniam, V., T. D. Le Cras, et al. (2003). "Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(5): L826-833.

Bauer, M., H. Wilkens, et al. (2002). "Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension." Circulation **105**(9): 1034-1036.

Bendeck, M. P., N. Zempo, et al. (1994). "Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat." Circ Res **75**(3): 539-545.

Benezra, M., I. Vlodavsky, et al. (1993). "Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix." Blood **81**(12): 3324-3331.

Benisty, J. I., V. V. McLaughlin, et al. (2004). "Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension." Chest **126**(4): 1255-1261.

Beppu, H., M. Kawabata, et al. (2000). "BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos." Dev Biol **221**(1): 249-258.

Berk, B. C. (2001). "Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms." Physiol Rev **81**(3): 999-1030.

Besser, D., M. Presta, et al. (1995). "Elucidation of a signaling pathway induced by FGF-2 leading to uPA gene expression in NIH 3T3 fibroblasts." Cell Growth Differ **6**(8): 1009-1017.

Bjornsson, J. and W. D. Edwards (1985). "Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases." Mayo Clin Proc **60**(1): 16-25.

Blanchet, E., J. S. Annicotte, et al. (2011). "E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1146-1152.

Blanpain, C., E. Le Poul, et al. (2003). "Serotonin 5-HT(2B) receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **60**(3): 518-528.

Bonnet, S., S. L. Archer, et al. (2007). "A mitochondria-K+ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth." Cancer Cell **11**(1): 37-51.

Bonnet, S., E. D. Michelakis, et al. (2006). "An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension." Circulation **113**(22): 2630-2641.

Bordron, A., M. Dueymes, et al. (1998). "The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis." J Clin Invest **101**(10): 2029-2035.

Botto, L., E. Beretta, et al. (2006). "Biochemical and morphological changes in endothelial cells in response to hypoxic interstitial edema." Respir Res **7**: 7.

Bouloumie, A., T. Marumo, et al. (1999). "Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells." FASEB J **13**(10): 1231-1238.

Brenner, B., J. T. Harney, et al. (2007). "Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter." J Neurochem **102**(1): 206-215.

Brenot, F., P. Herve, et al. (1993). "Primary pulmonary hypertension and fenfluramine use." Br Heart J **70**(6): 537-541.

Breuer, J., A. Georgaraki, et al. (1996). "Increased turnover of serotonin in children with pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease." Pediatr Cardiol **17**(4): 214-219.

Brock, M., M. Trenkmann, et al. (2009). "Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway." Circ Res **104**(10): 1184-1191.

Buczek-Thomas, J. A. and M. A. Nugent (1999). "Elastase-mediated release of heparan sulfate proteoglycans from pulmonary fibroblast cultures. A mechanism for basic fibroblast growth factor (bFGF) release and attenuation of bfgf binding following elastase-induced injury." J Biol Chem **274**(35): 25167-25172.

Bunting, S., R. Gryglewski, et al. (1976). "Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac ateries and inhibits platelet aggregation." Prostaglandins **12**(6): 897-913.

Bussone, G., M. Tamby, et al. (2012). "IgG from patients with pulmonary arterial hypertension and/or systemic sclerosis binds to vascular smooth muscle cells and induces cell contraction." Ann Rheum Dis. **71**(4): 596-605.

Cabodi, S., A. Tinnirello, et al. (2010). "p130Cas is an essential transducer element in ErbB2 transformation." FASEB J **24**(10): 3796-3808.

Cacoub, P., R. Dorent, et al. (1997). "Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **33**(1): 196-200.

Callebert, J., J. M. Esteve, et al. (2006). "Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice." J Pharmacol Exp Ther **317**(2): 724-731.

Campbell, A. I., M. A. Kuliszewski, et al. (1999). "Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol **21**(5): 567-575.

Campbell, A. I., Y. Zhao, et al. (2001). "Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Circulation **104**(18): 2242-2248.

Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-936.

Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.

Carvalho, D., C. O. Savage, et al. (1996). "IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines." J Clin Invest **97**(1): 111-119.

Champion, H. C., T. J. Bivalacqua, et al. (1999). "Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the lung of the mouse in vivo. Effect on agonist-induced and flow-mediated vascular responses." Circ Res **84**(12): 1422-1432.

Chaouat, A., F. Coulet, et al. (2004). "Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension." Thorax **59**(5): 446-448.

Chelladurai, P., W. Seeger, et al. (2012). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension." Eur Respir J. : In press.

Chesney, J., C. Metz, et al. (1999). "An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma." Mol Med **5**(3): 181-191.

Chida, A., M. Shintani, et al. (2012). "Missense Mutations of the BMPR1B (ALK6) Gene in Childhood Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension." Circ J.

Christ, G., S. Graf, et al. (2001). "Impairment of the plasmin activation system in primary pulmonary hypertension: evidence for gender differences." Thromb Haemost **86**(2): 557-562.

Christman, B. W., C. D. McPherson, et al. (1992). "An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension." N Engl J Med **327**(2): 70-75.

Christou, H., A. Yoshida, et al. (1998). "Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol **18**(6): 768-776.

Chu, D., C. C. Sullivan, et al. (2004). "A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1." Ann Thorac Surg **77**(2): 449-456; discussion 456-447.

Ciccolini, F. and C. N. Svendsen (1998). "Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursor cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2." J Neurosci **18**(19): 7869-7880.

Cines, D. B., E. S. Pollak, et al. (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." Blood **91**(10): 3527-3561.

Cogan, J. D., M. W. Pauciulo, et al. (2006). "High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **174**(5): 590-598.

Cogolludo, A., L. Moreno, et al. (2006). "Serotonin inhibits voltage-gated K+ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT2A receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization." Circ Res **98**(7): 931-938.

Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-295.

Cool, C. D., D. Kennedy, et al. (1997). "Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection." Hum Pathol **28**(4): 434-442.

Cool, C. D., J. S. Stewart, et al. (1999). "Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth." Am J Pathol **155**(2): 411-419.

Coppock, E. A., J. R. Martens, et al. (2001). "Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K+ channels." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(1): L1-12.

Coppock, E. A. and M. M. Tamkun (2001). "Differential expression of K(V) channel alpha- and beta-subunits in the bovine pulmonary arterial circulation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(6): L1350-1360.

Courboulin, A., R. Paulin, et al. (2011). "Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension." J Exp Med **208**(3): 535-548.

Cowan, K. N., A. Heilbut, et al. (2000). "Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor." Nat Med **6**(6): 698-702.

Cowan, K. N., P. L. Jones, et al. (1999). "Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis." Circ Res **84**(10): 1223-1233.

Cowan, K. N., P. L. Jones, et al. (2000). "Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease." J Clin Invest **105**(1): 21-34.

Culig, Z., H. Steiner, et al. (2005). "Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth." J Cell Biochem **95**(3): 497-505.

Dahal, B. K., T. Cornitescu, et al. (2010). "Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **181**(2): 158-167.

Daley, E., C. Emson, et al. (2008). "Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response." J Exp Med **205**(2): 361-372.

Davie, N. J., J. T. Crossno, Jr., et al. (2004). "Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(4): L668-678.

Defilippi, P., P. Di Stefano, et al. (2006). "p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks." Trends Cell Biol **16**(5): 257-263.

Deng, B., W. Huang, et al. (2011). "Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1/p130cas) in pulmonary disease tissue and serum." Mol Diagn Ther **15**(1): 31-40.

Deng, Z., J. H. Morse, et al. (2000). "Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene." Am J Hum Genet **67**(3): 737-744.

Dewachter, L., S. Adnot, et al. (2006). "Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **174**(9): 1025-1033.

Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (1999). "Nitric oxide-an endothelial cell survival factor." Cell Death Differ **6**(10): 964-968.

Ding, W., W. Shi, et al. (2007). "Sprouty2 downregulation plays a pivotal role in mediating crosstalk between TGF-beta1 signaling and EGF as well as FGF receptor tyrosine kinase-ERK pathways in mesenchymal cells." J Cell Physiol **212**(3): 796-806.

Dixit, V. D., M. Mielenz, et al. (2003). "Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism." Endocrinology **144**(12): 5595-5603.

Dorfmuller, P., V. Zarka, et al. (2002). "Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **165**(4): 534-539.

Douglas, J. G., J. F. Munro, et al. (1981). "Pulmonary hypertension and fenfluramine." Br Med J (Clin Res Ed) **283**(6296): 881-883.

Dresdale, D. T., R. J. Michtom, et al. (1954). "Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance." Bull N Y Acad Med **30**(3): 195-207.

Du, L., C. C. Sullivan, et al. (2003). "Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension." N Engl J Med **348**(6): 500-509.

Duffy, M. J. (2002). "Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies." Clin Chem **48**(8): 1194-1197.

Dumitrascu, R., C. Kulcke, et al. "Terguride ameliorates monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats." Eur Respir J.

Dumitrascu, R., N. Weissmann, et al. (2006). "Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling." Circulation **113**(2): 286-295.

Eddahibi, S., A. Chaouat, et al. (2003). "Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease." Circulation **108**(15): 1839-1844.

Eddahibi, S., A. Chaouat, et al. (2006). "Interleukin-6 gene polymorphism confers susceptibility to pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **3**(6): 475-476.

Eddahibi, S., C. Guignabert, et al. (2006). "Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia." Circulation **113**(15): 1857-1864.

Eddahibi, S., N. Hanoun, et al. (2000). "Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene." J Clin Invest **105**(11): 1555-1562.

Eddahibi, S., M. Humbert, et al. (2001). "Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension." J Clin Invest **108**(8): 1141-1150.

Eddahibi, S., M. Humbert, et al. (2002). "Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension." Chest **121**(3 Suppl): 97S-98S.

Eddahibi, S., M. Humbert, et al. (2000). "Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 1): 1493-1499.

Eddahibi, S., B. Raffestin, et al. (1998). "Effect of dexfenfluramine treatment in rats exposed to acute and chronic hypoxia." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1111-1119.

Eddahibi, S., B. Raffestin, et al. (1997). "Treatment with 5-HT potentiates development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats." Am J Physiol **272**(3 Pt 2): H1173-1181.

Edwards, B. S., E. K. Weir, et al. (1987). "Coexistent pulmonary and portal hypertension: morphologic and clinical features." J Am Coll Cardiol **10**(6): 1233-1238.

Eisenberg, P. R., C. Lucore, et al. (1990). "Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension." Circulation **82**(3): 841-847.

Fadel, E., O. Mercier, et al. (2010). "Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients." Eur J Cardiothorac Surg **38**(3): 277-284.

Fan, H., P. Hall, et al. (2011). "Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase." J Immunol **186**(8): 4915-4924.

Fartoukh, M., D. Emilie, et al. (1998). "Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension." Chest **114**(1 Suppl): 50S-51S.

Folkman, J. and P. A. D'Amore (1996). "Blood vessel formation: what is its molecular basis?" Cell **87**(7): 1153-1155.

Ford, V. A., C. Stringer, et al. (1992). "Thrombomodulin is preferentially expressed in Balb/c lung microvessels." J Biol Chem **267**(8): 5446-5450.

Franco, C. D., G. Hou, et al. (2002). "Collagens, integrins, and the discoidin domain receptors in arterial occlusive disease." Trends Cardiovasc Med **12**(4): 143-148.

Frasch, H. F., C. Marshall, et al. (1999). "Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L304-310.

Frid, M. G., V. A. Kale, et al. (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." Circ Res **90**(11): 1189-1196.

Frishman, W. H., S. Huberfeld, et al. (1995). "Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease." J Clin Pharmacol **35**(6): 541-572.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.

Fuster, V., P. M. Steele, et al. (1984). "Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis." Circulation **70**(4): 580-587.

Gambaryan, N., S. Cohen-Kaminsky, et al. (2012). "Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **39**(1): 210-212.

Gambaryan, N., F. Perros, et al. (2010). "Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit+ cell mobilisation in hypoxic pulmonary hypertension." Eur Respir J **36**(5): 1209-1211.

Gambaryan, N., F. Perros, et al. (2011). "Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension." Eur Respir J **37**(6): 1392-1399.

Gangopahyay, A., M. Oran, et al. (2011). "Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation." J Biol Chem **286**(38): 33134-33140.

Garcia-Cao, I., M. S. Song, et al. (2012). "Systemic Elevation of PTEN Induces a Tumor-Suppressive Metabolic State." Cell **149**(1): 49-62.

Geiger, R., R. M. Berger, et al. (2000). "Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease." J Pathol **191**(2): 202-207.

George, J., J. Sun, et al. (2012). "Transgenic expression of human matrix metalloproteinase-1 attenuates pulmonary arterial hypertension in mice." Clin Sci (Lond) **122**(2): 83-92.

George, S. J., J. L. Johnson, et al. (2001). "Plasmin-mediated fibroblast growth factor-2 mobilisation supports smooth muscle cell proliferation in human saphenous vein." J Vasc Res **38**(5): 492-501.

Geraci, M. W., B. Gao, et al. (1999). "Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension." J Clin Invest **103**(11): 1509-1515.

Ghofrani, H. A., N. W. Morrell, et al. (2010). "Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy." Am J Respir Crit Care Med **182**(9): 1171-1177.

Ghofrani, H. A., R. Voswinckel, et al. (2004). "Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study." J Am Coll Cardiol **44**(7): 1488-1496.

Giaid, A. (1998). "Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension." Chest **114**(3 Suppl): 208S-212S.

Giaid, A., R. P. Michel, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis." Lancet **341**(8860): 1550-1554.

Giaid, A. and D. Saleh (1995). "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **333**(4): 214-221.

Girerd, B., D. Montani, et al. (2010). "Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation." Am J Respir Crit Care Med **181**(8): 851-861.

Goda, N. and M. Kanai (2012). "Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism." Int J Hematol.

Goetze, S., A. Bungenstock, et al. (2002). "Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands." Hypertension **40**(5): 748-754.

Gomez-Arroyo, J. G., L. Farkas, et al. (2012). "The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(4): L363-369.

Goncalves, L. M. (1998). "Fibroblast growth factor-mediated angiogenesis for the treatment of ischemia. Lessons learned from experimental models and early human experience." Rev Port Cardiol **17 Suppl 2**: II11-20.

Gottlieb, E. and K. H. Vousden (2010). "p53 regulation of metabolic pathways." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(4): a001040.

Gourh, P., F. C. Arnett, et al. (2009). "Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations." Arthritis Res Ther **11**(5): R147.

Grouf, J. L., A. M. Throm, et al. (2007). "Differential effects of EGF and TGF-beta1 on fibroblast activity in fibrin-based tissue equivalents." Tissue Eng **13**(4): 799-807.

Guénard, H. (2001). Physiologie Humaine.

Guignabert, C. (2011). Interplay Between Serotonin Transporter Signaling and Voltage-Gated Potassium Channel (Kv) 1.5 Expression. Pulmonary Hypertension - From Bench Research to Clinical Challenges. D. R. S. (Ed.), InTech**:** 49-66.

Guignabert, C., C. M. Alvira, et al. (2009). "Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes PDGF receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1082-1090.

Guignabert, C., M. Izikki, et al. (2006). "Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension." Circ Res **98**(10): 1323-1330.

Guignabert, C., B. Raffestin, et al. (2005). "Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Circulation **111**(21): 2812-2819.

Guignabert, C., L. Tu, et al. (2009). "Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter." FASEB J **23**(12): 4135-4147.

Guilluy, C., S. Eddahibi, et al. (2009). "RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling." Am J Respir Crit Care Med **179**(12): 1151-1158.

Gurtner, H. P. (1985). "Aminorex and pulmonary hypertension. A review." Cor Vasa **27**(2-3): 160-171.

Hamid, R., J. D. Cogan, et al. (2009). "Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele." Hum Mutat **30**(4): 649-654.

Hanahan, D. (1997). "Signaling vascular morphogenesis and maintenance." Science **277**(5322): 48-50.

Hassoun, P. M., L. Mouthon, et al. (2009). "Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S10-19.

He, H., V. J. Venema, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src." J Biol Chem **274**(35): 25130-25135.

Herve, P., L. Drouet, et al. (1990). "Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin." Am J Med **89**(1): 117-120.

Herve, P., M. Humbert, et al. (2001). "Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis." Clin Chest Med **22**(3): 451-458.

Herve, P., J. M. Launay, et al. (1995). "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension." Am J Med **99**(3): 249-254.

Higenbottam, T., H. Marriott, et al. (1999). "The acute effects of dexfenfluramine on human and porcine pulmonary vascular tone and resistance." Chest **116**(4): 921-930.

Hilliker, K. S. and R. A. Roth (1984). "Alteration of monocrotaline pyrrole-induced cardiopulmonary effects in rats by hydrallazine, dexamethasone or sulphinpyrazone." Br J Pharmacol **82**(2): 375-380.

Hiramine, K., N. Sata, et al. (2011). "Hepatocyte growth factor improves the survival of rats with pulmonary arterial hypertension via the amelioration of pulmonary hemodynamics." Int J Mol Med **27**(4): 497-502.

Hironaka, E., M. Hongo, et al. (2003). "Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats." Cardiovasc Res **60**(3): 692-699.

Hirose, S., Y. Hosoda, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension." Pathol Int **50**(6): 472-479.

Hoffmann, J., J. Yin, et al. (2011). "Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension." Eur Respir J **37**(6): 1400-1410.

Hoggard, N., J. G. Mercer, et al. (1997). "Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization." Biochem Biophys Res Commun **232**(2): 383-387.

Holnthoner, W., M. Kerenyi, et al. (2006). "Regulation of matrilysin expression in endothelium by fibroblast growth factor-2." Biochem Biophys Res Commun **342**(3): 725-733.

Honda, H., H. Oda, et al. (1998). "Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas." Nat Genet **19**(4): 361-365.

Hong, K. H., Y. J. Lee, et al. (2008). "Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension." Circulation **118**(7): 722-730.

Hoshikawa, Y., N. F. Voelkel, et al. (2001). "Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling." Am J Respir Crit Care Med **164**(2): 314-318.

Huang, Z., D. Wang, et al. (2009). "Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice." Hum Mol Genet **18**(15): 2791-2801.

Huber, K., R. Beckmann, et al. (1994). "Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **150**(4): 929-933.

Hudson, J. D., M. A. Shoaibi, et al. (1999). "A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity." J Exp Med **190**(10): 1375-1382.

Huertas, A., L. Tu, et al. (2012). "Leptin and regulatory T lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J.

Humbert, M., Z. Deng, et al. (2002). "BMPR2 germline mutations in pulmonary hypertension associated with fenfluramine derivatives." Eur Respir J **20**(3): 518-523.

Humbert, M., G. Monti, et al. (1995). "Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **151**(5): 1628-1631.

Humbert, M., N. W. Morrell, et al. (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **43**(12 Suppl S): 13S-24S.

Humbert, M., O. Sitbon, et al. (2006). "Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry." Am J Respir Crit Care Med **173**(9): 1023-1030.

Humbert, M., O. Sitbon, et al. (2010). "Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **36**(3): 549-555.

Ieda, M., K. Fukuda, et al. (2004). "Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression." J Clin Invest **113**(6): 876-884.

Ilkiw, R., L. Todorovich-Hunter, et al. (1989). "SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Circ Res **64**(4): 814-825.

Imaizumi, T., H. Yoshida, et al. (2004). "Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells." J Atheroscler Thromb **11**(1): 15-21.

Izikki, M., C. Guignabert, et al. (2009). "Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents." J Clin Invest **119**(3): 512-523.

Izikki, M., N. Hanoun, et al. (2007). "Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(4): L1045-1052.

Jain, R. K. and M. F. Booth (2003). "What brings pericytes to tumor vessels?" J Clin Invest **112**(8): 1134-1136.

Jasmin, J. F., M. Lucas, et al. (2001). "Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Circulation **103**(2): 314-318.

Jerkic, M., M. G. Kabir, et al. (2011). "Pulmonary hypertension in adult Alk1 heterozygous mice due to oxidative stress." Cardiovasc Res **92**(3): 375-384.

Jiang, G. C., K. Tidwell, et al. (2007). "Neurotoxic potential of depleted uranium effects in primary cortical neuron cultures and in Caenorhabditis elegans." Toxicol Sci **99**(2): 553-565.

Johnson, S. R., J. T. Granton, et al. (2006). "Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension." Chest **130**(2): 545-552.

Jones, P. L., K. N. Cowan, et al. (1997). "Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease." Am J Pathol **150**(4): 1349-1360.

Jones, P. L., J. Crack, et al. (1997). "Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth." J Cell Biol **139**(1): 279-293.

Jones, P. L., F. S. Jones, et al. (1999). "Induction of vascular smooth muscle cell tenascin-C gene expression by denatured type I collagen is dependent upon a beta3 integrin-mediated mitogen-activated protein kinase pathway and a 122-base pair promoter element." J Cell Sci **112 (Pt 4)**: 435-445.

Jones, P. L. and M. Rabinovitch (1996). "Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation." Circ Res **79**(6): 1131-1142.

Kang, M. H. and C. P. Reynolds (2009). "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy." Clin Cancer Res **15**(4): 1126-1132.

Katta, S., S. Vadapalli, et al. (2008). "t-plasminogen activator inhibitor-1 polymorphism in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Indian J Hum Genet **14**(2): 37-40.

Kay, J. M., P. Smith, et al. (1969). "Electron microscopy of Crotalaria pulmonary hypertension." Thorax **24**(5): 511-526.

Keegan, A., I. Morecroft, et al. (2001). "Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935." Circ Res **89**(12): 1231-1239.

Kelvin, D. J., G. Simard, et al. (1989). "FGF and EGF act synergistically to induce proliferation in BC3H1 myoblasts." J Cell Physiol **138**(2): 267-272.

Kennedy, S. H., S. Rouda, et al. (1997). "Basic FGF regulates interstitial collagenase gene expression in human smooth muscle cells." J Cell Biochem **65**(1): 32-41.

Kereveur, A., J. Callebert, et al. (2000). "High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(10): 2233-2239.

Kerkela, R., L. Grazette, et al. (2006). "Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate." Nat Med **12**(8): 908-916.

Kherbeck, N., M. C. Tamby, et al. (2011). "The Role of Inflammation and Autoimmunity in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension." Clin Rev Allergy Immunol.

Kido, M., L. Du, et al. (2005). "Gene transfer of a TIE2 receptor antagonist prevents pulmonary hypertension in rodents." J Thorac Cardiovasc Surg **129**(2): 268-276.

Kim, W., Y. Seok Kang, et al. (2008). "The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in transforming growth factor-beta signaling." Mol Biol Cell **19**(5): 2135-2146.

Kim, Y. M., L. Haghighat, et al. (2011). "Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions." Am J Pathol **179**(3): 1560-1572.

Kimura, K., M. Ieda, et al. (2007). "Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy." Circ Res **100**(12): 1755-1764.

Kouri, F. M., M. A. Queisser, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension." Int J Biochem Cell Biol **40**(9): 1872-1882.

Kouyoumdjian, C., S. Adnot, et al. (1994). "Continuous inhalation of nitric oxide protects against development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats." J Clin Invest **94**(2): 578-584.

Kwapiszewska, G., P. Markart, et al. (2012). "PAR-2 Inhibition Reverses Experimental Pulmonary Hypertension." Circ Res.

La Cava, A., C. Alviggi, et al. (2004). "Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity." J Mol Med (Berl) **82**(1): 4-11.

La Cava, A. and G. Matarese (2004). "The weight of leptin in immunity." Nat Rev Immunol **4**(5): 371-379.

Lane, K. B., R. D. Machado, et al. (2000). "Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension." Nat Genet **26**(1): 81-84.

Langleben, D., B. W. Christman, et al. (2002). "Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension." Am Heart J **143**(5): E4.

Langleben, D. and L. M. Reid (1985). "Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy." Lab Invest **52**(3): 298-303.

Lantner, F., D. Starlets, et al. (2007). "CD74 induces TAp63 expression leading to B-cell survival." Blood **110**(13): 4303-4311.

Laudi, S., W. Steudel, et al. (2007). "Comparison of lung proteome profiles in two rodent models of pulmonary arterial hypertension." Proteomics **7**(14): 2469-2478.

Launay, J. M., P. Herve, et al. (2002). "Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension." Nat Med **8**(10): 1129-1135.

Launay, J. M., B. Schneider, et al. (2006). "Serotonin transport and serotonin transporter-mediated antidepressant recognition are controlled by 5-HT2B receptor signaling in serotonergic neuronal cells." Faseb J **20**(11): 1843-1854.

Lawrie, A., E. Spiekerkoetter, et al. (2005). "Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease." Circ Res **97**(3): 227-235.

Le Cras, T. D., W. D. Hardie, et al. (2003). "Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-alpha." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(5): L1046-1054.

Le Pavec, J., F. Perros, et al. (2009). "Cirrhosis ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Eur Respir J **34**(3): 731-739.

Lee, S. D., K. R. Shroyer, et al. (1998). "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension." J Clin Invest **101**(5): 927-934.

Lee, Y. S., J. Byun, et al. (2005). "Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung." Exp Mol Med **37**(1): 27-35.

Lepetit, H., S. Eddahibi, et al. (2005). "Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **25**(5): 834-842.

Letai, A. and L. Scorrano (2006). "Laying the foundations of programmed cell death." Cell Death Differ **13**(8): 1245-1247.

Li, H., S. J. Chen, et al. (1994). "Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia." J Appl Physiol **77**(3): 1451-1459.

Li, P., S. Oparil, et al. (2003). "Fibroblast growth factor mediates hypoxia-induced endothelin-- a receptor expression in lung artery smooth muscle cells." J Appl Physiol **95**(2): 643-651; discussion 863.

Liang, O. D., S. A. Mitsialis, et al. "Mesenchymal stromal cells expressing heme oxygenase-1 reverse pulmonary hypertension." Stem Cells **29**(1): 99-107.

Long, L., M. R. MacLean, et al. (2006). "Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice." Circ Res **98**(6): 818-827.

Loogen, F., H. Worth, et al. (1985). "Long-term follow-up of pulmonary hypertension in patients with and without anorectic drug intake." Cor Vasa **27**(2-3): 111-124.

Lopes, A. A., N. Y. Maeda, et al. (2000). "Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension." Am Heart J **139**(4): 618-623.

Louzier, V., B. Raffestin, et al. (2003). "Role of VEGF-B in the lung during development of chronic hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L926-937.

Loyd, J. E., M. G. Butler, et al. (1995). "Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **152**(1): 93-97.

Ma, W., W. Han, et al. (2011). "Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease." J Clin Invest **121**(11): 4548-4566.

Maccio, A., C. Madeddu, et al. (2009). "Adipose tissue as target organ in the treatment of hormone-dependent breast cancer: new therapeutic perspectives." Obes Rev **10**(6): 660-670.

Machado, R. D., M. A. Aldred, et al. (2006). "Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension." Hum Mutat **27**(2): 121-132.

Machado, R. D., O. Eickelberg, et al. (2009). "Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S32-42.

MacLean, M. R., G. A. Deuchar, et al. (2004). "Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circulation **109**(17): 2150-2155.

Maddocks, O. D. and K. H. Vousden (2011). "Metabolic regulation by p53." J Mol Med (Berl) **89**(3): 237-245.

Mandegar, M., Y. C. Fung, et al. (2004). "Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension." Microvasc Res **68**(2): 75-103.

Marcos, E., S. Adnot, et al. (2003). "Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **168**(4): 487-493.

Marcos, E., E. Fadel, et al. (2004). "Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension." Circ Res **94**(9): 1263-1270.

Marcos, E., E. Fadel, et al. (2005). "Serotonin transporter and receptors in various forms of human pulmonary hypertension." Chest **128**(6 Suppl): 552S-553S.

Maruyama, K., C. L. Ye, et al. (1991). "Chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats and increased elastolytic activity." Am J Physiol **261**(6 Pt 2): H1716-1726.

Mason, N. A., D. R. Springall, et al. (1998). "High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension." J Pathol **185**(3): 313-318.

Masri, F. A., W. Xu, et al. (2007). "Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L548-554.

Matarese, G., P. B. Carrieri, et al. (2005). "Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5150-5155.

Matarese, G., S. Moschos, et al. (2005). "Leptin in immunology." J Immunol **174**(6): 3137-3142.

McClelland, M., L. Zhao, et al. (2009). "Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer." Am J Pathol **174**(2): 638-646.

McMurtry, M. S., S. L. Archer, et al. (2005). "Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension." J Clin Invest **115**(6): 1479-1491.

McMurtry, M. S., S. Bonnet, et al. (2004). "Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis." Circ Res **95**(8): 830-840.

Merk, M., S. Zierow, et al. (2011). "The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF)." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): E577-585.

Merklinger, S. L., P. L. Jones, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension." Circulation **112**(3): 423-431.

Merklinger, S. L., R. A. Wagner, et al. (2005). "Increased fibulin-5 and elastin in S100A4/Mts1 mice with pulmonary hypertension." Circ Res **97**(6): 596-604.

Meyer-Siegler, K. L., K. A. Iczkowski, et al. (2006). "Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells." J Immunol **177**(12): 8730-8739.

Meyer-Siegler, K. L., K. A. Iczkowski, et al. (2005). "Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer." BMC Cancer **5**: 73.

Meyrick, B. and L. Reid (1980). "Ultrastructural findings in lung biopsy material from children with congenital heart defects." Am J Pathol **101**(3): 527-542.

Michelakis, E. D., M. S. McMurtry, et al. (2002). "Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels." Circulation **105**(2): 244-250.

Michelakis, E. D., L. Webster, et al. (2008). "Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer." Br J Cancer **99**(7): 989-994.

Mitani, Y., M. Ueda, et al. (1999). "Mast cell chymase in pulmonary hypertension." Thorax **54**(1): 88-90.

Miyata, M., F. Sakuma, et al. (1995). "Pulmonary hypertension in rats. 2. Role of interleukin-6." Int Arch Allergy Immunol **108**(3): 287-291.

Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.

Montani, D., E. Bergot, et al. (2012). "Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib." Circulation.

Montani, D., M. Humbert, et al. (2011). "Letter by Montani et al regarding article, "Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension"." Circulation **123**(21): e614; author reply e615.

Montani, D., F. Perros, et al. (2011). "C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **184**(1): 116-123.

Montani, D., L. Savale, et al. (2010). "Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension." Eur Heart J **31**(15): 1898-1907.

Morecroft, I., R. P. Heeley, et al. (1999). "5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT1B receptor." Br J Pharmacol **128**(3): 730-734.

Morecroft, I., L. Loughlin, et al. (2005). "Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the serotonin transporter in pulmonary arteries." J Pharmacol Exp Ther **313**(2): 539-548.

Morrell, N. W., S. Adnot, et al. (2009). "Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S20-31.

Morse, J. H., S. Antohi, et al. (2000). "Fine specificity of anti-fibrillin-1 autoantibodies in primary pulmonary hypertension syndrome." Scand J Immunol **51**(6): 607-611.

Morse, J. H., A. C. Jones, et al. (1997). "Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32." Circulation **95**(12): 2603-2606.

Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer **4**(11): 839-849.

Mulvany, M. J. and C. Aalkjaer (1990). "Structure and function of small arteries." Physiol Rev **70**(4): 921-961.

Murillo, M. M., G. del Castillo, et al. (2005). "Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF-beta1 in hepatocytes." Oncogene **24**(28): 4580-4587.

Mushaben, E. M., G. K. Hershey, et al. (2012). "Chronic allergic inflammation causes vascular remodeling and pulmonary hypertension in BMPR2 hypomorph and wild-type mice." PLoS One **7**(3): e32468.

Myers, T. J., F. Granero-Molto, et al. (2010). "Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy." Expert Opin Biol Ther **10**(12): 1663-1679.

Naeije, R. and L. Dewachter (2007). "[Animal models of pulmonary arterial hypertension]." Rev Mal Respir **24**(4 Pt 1): 481-496.

Nagy, J. A., A. M. Dvorak, et al. (2012). "Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a006544.

Nasim, M. T., T. Ogo, et al. (2011). "Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension." Hum Mutat **32**(12): 1385-1389.

Newman, J. H., L. Wheeler, et al. (2001). "Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred." N Engl J Med **345**(5): 319-324.

Nichols, W. C., D. L. Koller, et al. (1997). "Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32." Nat Genet **15**(3): 277-280.

Nilsson, O., L. E. Ericson, et al. (1985). "Subcellular localization of serotonin immunoreactivity in rat enterochromaffin cells." Histochemistry **82**(4): 351-355.

Nishida, M., K. Eshiro, et al. (2004). "Roles of endothelin ETA and ETB receptors in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension." J Cardiovasc Pharmacol **44**(2): 187-191.

Nishida, M., Y. Okada, et al. (2004). "Role of endothelin ETB receptor in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Eur J Pharmacol **496**(1-3): 159-165.

Nishihara, A., T. Watabe, et al. (2002). "Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension." Mol Biol Cell **13**(9): 3055-3063.

O'Callaghan, D. S., L. Savale, et al. (2011). "Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies." Nat Rev Cardiol **8**(9): 526-538.

Obata, H., Y. Sakai, et al. (2008). "Single injection of a sustained-release prostacyclin analog improves pulmonary hypertension in rats." Am J Respir Crit Care Med **177**(2): 195-201.

Oda, S., T. Oda, et al. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner." PLoS One **3**(5): e2215.

Oda, Y., B. Renaux, et al. (1999). "cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue." Can J Physiol Pharmacol **77**(8): 606-617.

Ono, M., Y. Sawa, et al. (2004). "Gene transfer of hepatocyte growth factor with prostacyclin synthase in severe pulmonary hypertension of rats." Eur J Cardiothorac Surg **26**(6): 1092-1097.

Ono, M., Y. Sawa, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats." Circulation **110**(18): 2896-2902.

Orpana, A. and P. Salven (2002). "Angiogenic and lymphangiogenic molecules in hematological malignancies." Leuk Lymphoma **43**(2): 219-224.

Otero, M., R. Lago, et al. (2005). "Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights." FEBS Lett **579**(2): 295-301.

Ozawa, K., K. Sato, et al. (2008). "Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)." J Autoimmun **30**(3): 121-127.

Park, H. Y., H. M. Kwon, et al. (2001). "Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro." Exp Mol Med **33**(2): 95-102.

Park, J. S., J. Y. Kim, et al. (2000). "Epidermal growth factor (EGF) antagonizes transforming growth factor (TGF)-beta1-induced collagen lattice contraction by human skin fibroblasts." Biol Pharm Bull **23**(12): 1517-1520.

Partovian, C., S. Adnot, et al. (1998). "Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): H1948-1956.

Partovian, C., S. Adnot, et al. (2000). "Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(6): 762-771.

Perros, F., P. Dorfmuller, et al. (2012). "Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **185**(3): 311-321.

Perros, F., P. Dorfmuller, et al. (2007). "Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension." Eur Respir J **29**(5): 937-943.

Perros, F., D. Montani, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **178**(1): 81-88.

Pietra, G. G., W. D. Edwards, et al. (1989). "Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry." Circulation **80**(5): 1198-1206.

Pintucci, G., P. J. Yu, et al. (2003). "Induction of stromelysin-1 (MMP-3) by fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in FGF-2-/- microvascular endothelial cells requires prolonged activation of extracellular signal-regulated kinases-1 and -2 (ERK-1/2)." J Cell Biochem **90**(5): 1015-1025.

Price, L. C., S. J. Wort, et al. (2012). "Inflammation in pulmonary arterial hypertension." Chest **141**(1): 210-221.

Puzio-Kuter, A. M. (2011). "The Role of p53 in Metabolic Regulation." Genes Cancer **2**(4): 385-391.

Pylayeva, Y., K. M. Gillen, et al. (2009). "Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling." J Clin Invest **119**(2): 252-266.

Qin, W., B. Zhao, et al. (2009). "BMPRII is a direct target of miR-21." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **41**(7): 618-623.

Quinlan, T. R., D. Li, et al. (2000). "eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(4): L641-650.

Quinn, T. P., M. Schlueter, et al. (2002). "Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(5): L897-903.

Rabinovitch, M. (1999). "EVE and beyond, retro and prospective insights." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): L5-12.

Rabinovitch, M. (2001). "Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix." Clin Chest Med **22**(3): 433-449, viii.

Rabinovitch, M. (2005). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary hypertension conference summary." Chest **128**(6 Suppl): 642S-646S.

Rabinovitch, M. (2008). "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." J Clin Invest **118**(7): 2372-2379.

Rabinovitch, M., M. Andrew, et al. (1987). "Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects." Circulation **76**(5): 1043-1052.

Raines, E. W. (2004). "PDGF and cardiovascular disease." Cytokine Growth Factor Rev **15**(4): 237-254.

Raines, E. W. and N. Ferri (2005). "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease." J Lipid Res **46**(6): 1081-1092.

Ray, L., M. Mathieu, et al. (2008). "Early increase in pulmonary vascular reactivity with overexpression of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in canine experimental heart failure." Exp Physiol **93**(3): 434-442.

Remillard, C. V., D. D. Tigno, et al. (2007). "Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1837-1853.

Ren, W., S. W. Watts, et al. "Serotonin transporter interacts with the PDGFbeta receptor in PDGF-BB-induced signaling and mitogenesis in pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(3): L486-497.

Reynolds, A. M., M. D. Holmes, et al. (2012). "Targeted gene delivery of BMPR2 attenuates pulmonary hypertension." Eur Respir J **39**(2): 329-343.

Ribatti, D., D. Leali, et al. (1999). "In vivo angiogenic activity of urokinase: role of endogenous fibroblast growth factor-2." J Cell Sci **112 (Pt 23)**: 4213-4221.

Rich, S., K. Hart, et al. (1987). "Thromboxane synthetase inhibition in primary pulmonary hypertension." Chest **91**(3): 356-360.

Rich, S., K. Kieras, et al. (1986). "Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **8**(6): 1307-1311.

Rich, S., J. Pogoriler, et al. (2010). "Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Chest **138**(5): 1234-1239.

Rich, S., L. Rubin, et al. (2000). "Anorexigens and pulmonary hypertension in the United States: results from the surveillance of North American pulmonary hypertension." Chest **117**(3): 870-874.

Roberts, J. D., Jr., J. D. Chiche, et al. (2000). "Nitric oxide inhalation decreases pulmonary artery remodeling in the injured lungs of rat pups." Circ Res **87**(2): 140-145.

Rondelet, B., F. Kerbaul, et al. (2003). "Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension." Circulation **107**(9): 1329-1335.

Rubin, L. J. (1999). "Cellular and molecular mechanisms responsible for the pathogenesis of primary pulmonary hypertension." Pediatr Pulmonol Suppl **18**: 194-197.

Rubin, L. J., D. B. Badesch, et al. (2002). "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **346**(12): 896-903.

Rubin, L. J., D. B. Badesch, et al. (2011). "Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study." Chest **140**(5): 1274-1283.

Rudarakanchana, N., J. A. Flanagan, et al. (2002). "Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension." Hum Mol Genet **11**(13): 1517-1525.

Rudge, J. S., G. Thurston, et al. (2003). "Angiopoietin-1 and pulmonary hypertension: cause or cure?" Circ Res **92**(9): 947-949.

Ruest, P. J., N. Y. Shin, et al. (2001). "Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src." Mol Cell Biol **21**(22): 7641-7652.

Ruf, A. and E. Morgenstern (1995). "Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures." Semin Thromb Hemost **21**(2): 119-122.

Ryan, J., K. Bloch, et al. (2011). "Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH." Int J Clin Pract Suppl(172): 15-34.

Said, S. I., S. A. Hamidi, et al. (2007). "Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene." Circulation **115**(10): 1260-1268.

Sakai, R., A. Iwamatsu, et al. (1994). "A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner." Embo J **13**(16): 3748-3756.

Sakamaki, F., S. Kyotani, et al. (2000). "Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy." Circulation **102**(22): 2720-2725.

Sakao, S., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2007). "VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34+ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells." FASEB J **21**(13): 3640-3652.

Sakao, S., K. Tatsumi, et al. (2009). "Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation." Respir Res **10**: 95.

Sakao, S., K. Tatsumi, et al. (2010). "Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(6): 629-634.

Sanchez, O., E. Marcos, et al. (2007). "Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **176**(10): 1041-1047.

Sanchez, O., O. Sitbon, et al. (2006). "Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension." Chest **130**(1): 182-189.

Sands, M., K. Howell, et al. (2011). "Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung." Respir Res **12**: 17.

Sato, K., S. Webb, et al. (1992). "Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat." Am Rev Respir Dis **145**(4 Pt 1): 793-797.

Savale, L., M. C. Chaumais, et al. (2012). "Pulmonary hypertension associated with benfluorex exposure." Eur Respir J.

Savale, L., L. Tu, et al. (2009). "Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice." Respir Res **10**: 6.

Schermuly, R. T., E. Dony, et al. (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-2821.

Schermuly, R. T., H. A. Ghofrani, et al. (2011). "Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension." Nat Rev Cardiol **8**(8): 443-455.

Schermuly, R. T., C. Inholte, et al. (2005). "Lung vasodilatory response to inhaled iloprost in experimental pulmonary hypertension: amplification by different type phosphodiesterase inhibitors." Respir Res **6**: 76.

Schermuly, R. T., H. Yilmaz, et al. (2005). "Inhaled iloprost reverses vascular remodeling in chronic experimental pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **172**(3): 358-363.

Schober, A. (2008). "Chemokines in vascular dysfunction and remodeling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1950-1959.

Selimovic, N., C. H. Bergh, et al. (2009). "Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension." Eur Respir J **34**(3): 662-668.

Shachar, I. and M. Haran (2011). "The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival." Leuk Lymphoma **52**(8): 1446-1454.

Shin, N. Y., R. S. Dise, et al. (2004). "Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration." J Biol Chem **279**(37): 38331-38337.

Shintani, M., H. Yagi, et al. (2009). "A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension." J Med Genet **46**(5): 331-337.

Simonneau, G., I. M. Robbins, et al. (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S43-54.

Song, S., M. G. Wientjes, et al. (2000). "Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8658-8663.

Song, Y., L. Coleman, et al. (2008). "Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(2): H677-690.

Soon, E., A. M. Holmes, et al. (2010). "Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension." Circulation **122**(9): 920-927.

Starlets, D., Y. Gore, et al. (2006). "Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival." Blood **107**(12): 4807-4816.

Steiner, M. K., O. L. Syrkina, et al. (2009). "Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension." Circ Res **104**(2): 236-244, 228p following 244.

Stenmark, K. R. and M. G. Frid (1998). "Smooth muscle cell heterogeneity: role of specific smooth muscle cell subpopulations in pulmonary vascular disease." Chest **114**(1 Suppl): 82S-90S.

Stenmark, K. R., E. Gerasimovskaya, et al. (2002). "Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling." Chest **122**(6 Suppl): 326S-334S.

Stenmark, K. R., B. Meyrick, et al. (2009). "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1013-1032.

Stitham, J., C. Midgett, et al. (2011). "Prostacyclin: an inflammatory paradox." Front Pharmacol **2**: 24.

Sullivan, C. C., L. Du, et al. (2003). "Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12331-12336.

Sundaram, N., A. Tailor, et al. (2010). "High levels of placenta growth factor in sickle cell disease promote pulmonary hypertension." Blood **116**(1): 109-112.

Sutendra, G., S. Bonnet, et al. (2010). "Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension." Sci Transl Med **2**(44): 44ra58.

Sztrymf, B., F. Coulet, et al. (2008). "Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation." Am J Respir Crit Care Med **177**(12): 1377-1383.

Ta, H. Q., K. S. Thomas, et al. (2008). "A novel association between p130Cas and resistance to the chemotherapeutic drug adriamycin in human breast cancer cells." Cancer Res **68**(21): 8796-8804.

Takahashi, H., N. Goto, et al. (2006). "Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(3): L450-458.

Tamby, M. C., Y. Chanseaud, et al. (2005). "Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension." Thorax **60**(9): 765-772.

Tamby, M. C., M. Humbert, et al. (2006). "Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension." Eur Respir J **28**(4): 799-807.

Tamosiuniene, R., W. Tian, et al. (2011). "Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension." Circ Res **109**(8): 867-879.

Tanabe, Y., M. Saito, et al. (2000). "Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells." Mol Cell Biochem **215**(1-2): 103-113.

Taraseviciene-Stewart, L., Y. Kasahara, et al. (2001). "Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension." FASEB J **15**(2): 427-438.

Taraseviciene-Stewart, L., M. R. Nicolls, et al. (2007). "Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling." Am J Respir Crit Care Med **175**(12): 1280-1289.

Teichert-Kuliszewska, K., M. J. Kutryk, et al. (2006). "Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension." Circ Res **98**(2): 209-217.

Terrier, B., M. C. Tamby, et al. (2008). "Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **177**(10): 1128-1134.

Thompson, K. and M. Rabinovitch (1996). "Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor." J Cell Physiol **166**(3): 495-505.

Toporsian, M., M. Jerkic, et al. (2010). "Spontaneous adult-onset pulmonary arterial hypertension attributable to increased endothelial oxidative stress in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(3): 509-517.

Trembath, R. C., J. R. Thomson, et al. (2001). "Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia." N Engl J Med **345**(5): 325-334.

Tu, L., L. Dewachter, et al. (2011). "Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol **45**(2): 311-322.

Tuder, R. M., M. Chacon, et al. (2001). "Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis." J Pathol **195**(3): 367-374.

Tuder, R. M., C. D. Cool, et al. (1999). "Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1925-1932.

Tuder, R. M., B. Groves, et al. (1994). "Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension." Am J Pathol **144**(2): 275-285.

Ueno, A., H. Naraba, et al. (2000). "Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in IP-receptor-deficient mice." Life Sci **66**(12): PL155-160.

Ueno, M., T. Miyauchi, et al. (2000). "Endothelin-A-receptor antagonist and oral prostacyclin analog are comparably effective in ameliorating pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats." J Cardiovasc Pharmacol **36**(5 Suppl 1): S305-310.

Uttamsingh, S., X. Bao, et al. (2008). "Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells." Oncogene **27**(18): 2626-2634.

van der Flier, S., A. Brinkman, et al. (2000). "Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment." J Natl Cancer Inst **92**(2): 120-127.

Vane, J. R., E. E. Anggard, et al. (1990). "Regulatory functions of the vascular endothelium." N Engl J Med **323**(1): 27-36.

Vanhoutte, P. M. (1991). "Platelet-derived serotonin, the endothelium, and cardiovascular disease." J Cardiovasc Pharmacol **17 Suppl 5**: S6-12.

Veillat, V., C. Carli, et al. (2010). "Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways." J Clin Endocrinol Metab **95**(12): E403-412.

Verjans, E., E. Noetzel, et al. (2009). "Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer." BMC Cancer **9**: 230.

Vieillard-Baron, A., E. Frisdal, et al. (2000). "Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats." Circ Res **87**(5): 418-425.

Vieillard-Baron, A., E. Frisdal, et al. (2003). "Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats." Hum Gene Ther **14**(9): 861-869.

Voelkel, N. F., C. Cool, et al. (1998). "Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer." Chest **114**(3 Suppl): 225S-230S.

Voelkel, N. F., C. Cool, et al. (2002). "Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension." Crit Care Med **30**(5 Suppl): S251-256.

Voelkel, N. F. and R. M. Tuder (1995). "Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension." Eur Respir J **8**(12): 2129-2138.

Voelkel, N. F. and R. M. Tuder (1997). "Cellular and molecular biology of vascular smooth muscle cells in pulmonary hypertension." Pulm Pharmacol Ther **10**(5-6): 231-241.

Voelkel, N. F., R. M. Tuder, et al. (1994). "Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline." Am J Respir Cell Mol Biol **11**(6): 664-675.

Voelkel, N. F., R. M. Tuder, et al. (1996). "Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats." J Clin Invest **97**(11): 2491-2498.

Voelkel, N. F., R. W. Vandivier, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor in the lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(2): L209-221.

Wang, J., A. Yao, et al. (1999). "cDNA cloning and sequencing, gene expression, and immunolocalization of thrombomodulin in the Sprague-Dawley rat." DNA Res **6**(1): 57-62.

Wang, Y., D. D. Han, et al. "Downregulation of Osteopontin Is Associated with Fluoxetine Amelioration of Monocrotaline-Induced Pulmonary Inflammation and Vascular Remodelling." Clin Exp Pharmacol Physiol.

Wedgwood, S., J. M. Devol, et al. (2007). "Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension." Pediatr Res **61**(1): 32-36.

Wei, L., R. Warburton, et al. (2012). "Serotonylated Fibronectin is Elevated in Pulmonary Hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **In press**.

Welsh, C. H., K. L. Hassell, et al. (1996). "Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension." Chest **110**(3): 710-717.

Wendt, M. K., J. A. Smith, et al. (2009). "p130Cas is required for mammary tumor growth and transforming growth factor-beta-mediated metastasis through regulation of Smad2/3 activity." J Biol Chem **284**(49): 34145-34156.

West, J., K. Fagan, et al. (2004). "Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle." Circ Res **94**(8): 1109-1114.

White, R. J., D. F. Meoli, et al. (2007). "Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L583-590.

Witzenrath, M., B. Ahrens, et al. (2006). "Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness." Eur Respir J **28**(2): 370-377.

Wright, L., R. M. Tuder, et al. (1998). "5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity in lungs from patients with primary pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 219-229.

Xie, W., H. Wang, et al. (2004). "Effects of iptakalim hydrochloride, a novel KATP channel opener, on pulmonary vascular remodeling in hypoxic rats." Life Sci **75**(17): 2065-2076.

Xu, W., T. Koeck, et al. (2007). "Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1342-1347.

Yamboliev, I. A. and W. T. Gerthoffer (2001). "Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs." Am J Physiol Cell Physiol **280**(6): C1680-1688.

Yang, X., L. Long, et al. (2005). "Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension." Circ Res **96**(10): 1053-1063.

Yeager, M. E., G. R. Halley, et al. (2001). "Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension." Circ Res **88**(1): E2-E11.

Young, A. N., M. B. Amin, et al. (2001). "Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers." Am J Pathol **158**(5): 1639-1651.

Yu, P. B., H. Beppu, et al. (2005). "Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells." J Biol Chem **280**(26): 24443-24450.

Zaidi, S. H., X. M. You, et al. (2002). "Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension." Circulation **105**(4): 516-521.

Zernecke, A. and C. Weber (2005). "Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease." Basic Res Cardiol **100**(2): 93-101.

Zhai, F. G., X. H. Zhang, et al. (2009). "Fluoxetine protects against monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: potential roles of induction of apoptosis and upregulation of Kv1.5 channels in rats." Clin Exp Pharmacol Physiol **36**(8): 850-856.

Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.

Zhao, L., N. A. Mason, et al. (2003). "Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity." Circulation **107**(2): 234-237.

Zhao, Y. D., A. I. Campbell, et al. (2003). "Protective role of angiopoietin-1 in experimental pulmonary hypertension." Circ Res **92**(9): 984-991.

Zhao, Y. D., D. W. Courtman, et al. (2005). "Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease." Circ Res **96**(4): 442-450.

Zhu, S. P., Z. F. Mao, et al. (2009). "Continuous fluoxetine administration prevents recurrence of pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats." Clin Exp Pharmacol Physiol **36**(8): e1-5.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave caractérisée par une obstruction progressive des petites artères pulmonaires, conduisant à une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et à terme à une défaillance cardiaque droite et au décès du patient. La vasoconstriction, le remodelage vasculaire pulmonaire, la thrombose *in situ* et la dysfonction endothéliale sont autant de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la maladie. Ces travaux de doctorat ont visé à préciser et mieux comprendre le phénotype anormal de la cellule endothéliale (CE) pulmonaire de patients HTAP afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques adéquates pour corriger et restaurer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension pulmonaire. Plusieurs perturbations fonctionnelles liées à des anomalies moléculaires ont pu être identifiées. Les CE HTAPi sont caractérisées par une prolifération, une migration, une survie et une réponse excessive à différents facteurs de croissance : PDGF, EGF, et FGF2. Parmi les anomalies moléculaires à l'origine de ces perturbations fonctionnelles, nous avons retrouvé une production et une libération anormale de FGF2, de MMP2, de MIF, d'IL-6 et de MCP-1, mais aussi une activité constitutive de la MAPK, une surexpression des facteurs anti-apoptotiques BCL2 et BCL-xL, de FGFR2, de $p130^{cas}$ et de CD74. Cette meilleure compréhension de la CE-HTAPi a déjà permis d'identifier plusieurs cibles qui pourraient être évaluées et à aussi permis de soulever un certain nombre de questions qui requiert des études plus poussées.

Mots clés : HTAP ; Dysfonction Endothéliale ; Innovations Thérapeutiques ; Facteurs de Croissance ; Inflammation ; Signalisation Cellulaire ; Prolifération ; Apoptose ; Modèles Animaux ;

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
FACULTÉ DE PHARMACIE
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

INSERM UMR999
Hôpital Marie Lannelongue
133 avenue de la Résistance
92350 Le Plessis Robinson