



**HAL**  
open science

# Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire : rôle des facteurs vaso-actifs et de l'inflammation

Olivier Sanchez

► **To cite this version:**

Olivier Sanchez. Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire : rôle des facteurs vaso-actifs et de l'inflammation. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2010. Français. NNT : 2010PEST0027 . tel-00663325

**HAL Id: tel-00663325**

**<https://theses.hal.science/tel-00663325>**

Submitted on 26 Jan 2012

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

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

# Université Paris-Est

Année 2010

## Thèse

Pour obtenir le grade de

### Docteur de l'Université Paris-Est

Spécialité : Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Olivier SANCHEZ**

Le 1<sup>er</sup> Décembre 2010

## **Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire : rôle des facteurs vaso-actifs et de l'inflammation**

Directrice de Thèse : Mme le Dr Saadia EDDAHIBI

### JURY

M. le Pr Marc HUMBERT	Président
Mme le Pr Dominique ISRAËL-BIET	Rapporteur
M. le Pr Anh-Tuan DINH-XUAN	Rapporteur
M. le Pr Bernard MAITRE	Examineur
M. le Pr Olivier SITBON	Examineur
Mme le Dr Saadia EDDAHIBI	Directrice de Thèse

## **Remerciements**

### **Au Professeur Marc Humbert**

Tu as guidé mes premiers pas dans la connaissance des maladies vasculaires pulmonaires et mes premiers travaux scientifiques. Ton enthousiasme et ta rigueur font de toi un exemple à suivre. Tu me fais l'honneur de présider le jury de cette Thèse. Reçois mon amitié et ma gratitude

### **Au Docteur Saadia Eddahibi**

Tu m'as initié à la recherche biologique. Tu as toujours su partager tes connaissances avec entrain. Ta patience, ton indulgence et ta disponibilité ont permis la réalisation de ce travail. Je t'en suis très sincèrement reconnaissant.

### **Au Professeur Dominique Israël-Biet**

Tu m'accompagnes depuis mes premiers pas en pneumologie et tu m'as toujours soutenu tout au long de mon parcours professionnel. Tu me fais l'honneur de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Reçois mon amitié et ma reconnaissance.

### **Au Professeur Anh-Tuan Dinh-Xuan**

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse et d'en être le rapporteur. Je vous en remercie très sincèrement.

### **Au Professeur Olivier Sitbon**

Tu m'as transmis tes connaissances de la circulation pulmonaire et des maladies vasculaires pulmonaires avec enthousiasme. Tu me fais l'honneur et l'amitié de juger ce travail. Reçois mon amitié et ma gratitude.

### **Au Professeur Bernard Maitre**

Tu me fais l'honneur et l'amitié de juger cette thèse. Reçois mon amitié et ma reconnaissance

**Je tiens à remercier:**

- Le Professeur Serge Adnot pour m'avoir accueilli avec bienveillance dans son unité à la faculté de médecine de Créteil et aidé dans la réalisation de ce travail
- Les Professeurs Philippe Dartevelle et Elie Fadel pour nous avoir fourni le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail
- Christophe Guignabert, Laurence Dewachter, Ly Tu, Elisabeth Marcos, Patricia Zadigue, Anne-Marie Barlier-Mur pour leur aide précieuse et leur gentillesse
- Mes collègues du service de pneumologie de l'hôpital européen Georges Pompidou pour m'avoir permis de m'extraire de mes occupations cliniques pour me consacrer à la réalisation de ce travail

**A Stéphanie,**

**A Antoine, Guillaume et Emma,**

**A mes parents et ma famille,**

Pour leur amour et leur soutien, et sans lesquels je ne pourrai consacrer tant de temps à mon activité de recherche.

## Table des matières

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Définition et classification des hypertensions pulmonaires.....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	7
1.1.2	Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire .....	14
1.1.3	Hypertension pulmonaire associée à une cardiopathie gauche.....	14
1.1.4	Hypertension pulmonaire associée aux affections respiratoires et/ou à l'hypoxie .....	15
1.1.5	Hypertension pulmonaire secondaire à une maladie thromboembolique chronique .....	15
1.1.6	Hypertension due à un ou plusieurs mécanismes .....	16
<b>1.2</b>	<b>Anatomie pathologique .....</b>	<b>18</b>
1.2.1	Fibrose intimale concentrique .....	18
1.2.2	Fibrose intimale excentrique et lésion thrombotique .....	18
1.2.3	Hypertrophie de la média .....	19
1.2.4	Lésions complexes.....	19
1.2.5	Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP).....	20
1.2.6	Hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP) .....	20
<b>1.3</b>	<b>Aspects cellulaires.....</b>	<b>21</b>
1.3.1	Cellule endothéliale.....	22
1.3.2	Cellule musculaire lisse .....	23
1.3.3	Fibroblaste.....	24
1.3.4	Plaquettes.....	25
<b>1.4</b>	<b>Aspects moléculaires impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire .....</b>	<b>26</b>
1.4.1	Prostaglandines et récepteurs aux prostaglandines.....	26
1.4.2	Monoxyde d'azote (NO) .....	27
1.4.3	Endothéline-1 .....	32
1.4.4	La superfamille du Transforming Growth Factor beta (TGFβ) .....	38
1.4.5	La sérotonine.....	47
1.4.6	Chimiokines et mécanismes inflammatoires .....	56
<b>2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>70</b>

<b>2.1</b>	<b>Prélèvements humains.....</b>	<b>70</b>
2.1.1	Patients.....	70
2.1.2	Traitement du tissu humain .....	71
2.1.3	Prélèvements sanguins.....	71
2.1.4	Culture des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires.....	72
2.1.5	Culture des cellules endothéliales.....	72
<b>3</b>	<b>TRAVAUX DE RECHERCHE .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Première étude .....</b>	<b>75</b>
3.1.1	Principaux résultats .....	77
3.1.2	Conclusions.....	78
<b>3.2</b>	<b>Deuxième étude .....</b>	<b>79</b>
3.2.1	Principaux résultats .....	81
3.2.2	Conclusions.....	84
<b>3.3</b>	<b>Troisième étude .....</b>	<b>85</b>
3.3.1	Introduction.....	86
3.3.2	Matériel et méthodes .....	87
3.3.3	Résultats .....	94
3.3.4	Discussion .....	99
<b>4</b>	<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>105</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>114</b>

# 1 INTRODUCTION

## ***1.1 Définition et classification des hypertensions pulmonaires***

L'hypertension pulmonaire (HTP) est un ensemble de maladies se traduisant par une élévation permanente des pressions dans la circulation pulmonaire. Elle se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos sur le cathétérisme cardiaque droit (1). Autrefois considérée comme primitive, c'est-à-dire sans cause retrouvée ou secondaire à une affection identifiée, la classification des HTP a profondément évolué ces dernières années. Cette classification, récemment modifiée lors du quatrième Symposium de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2008 (1), maintient la philosophie et l'organisation de la précédente classification et distingue cinq catégories d'hypertension pulmonaire (Tableau 1). Elle a pour objectif d'individualiser des catégories de pathologies présentant des similitudes dans leur physiopathologie, leur présentation clinique et surtout leur prise en charge thérapeutique.

### ***1.1.1 Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)***

Sous le terme d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) sont regroupées différentes maladies touchant la microcirculation pulmonaire. Ces formes sont caractérisées par un intense remodelage vasculaire pulmonaire affectant principalement les artérioles pulmonaires musculaires de moins de 500 µm de diamètre. Ces lésions associent une hypertrophie concentrique de l'intima dite « en bulbe d'oignon », une hypertrophie de la média, des lésions dites plexiformes et des microthromboses. Récemment, un registre national français a permis d'estimer la prévalence de l'HTAP à 15 cas par million d'habitants et l'incidence à 2,4 cas par million d'habitants par an (2). Le diagnostic est souvent fait de



façon retardée puisque 75% des patients ont une dyspnée d'effort classée stade III ou IV de la New York Heart Association (NYHA) au moment du diagnostic (2).

#### 1.1.1.1 HTAP idiopathique

Lorsqu'elle survient en l'absence de condition associée, l'HTAP est considérée comme idiopathique (anciennement « primitive »). Elle représentait 39,2% des cas dans le registre français (2). L'âge moyen au moment du diagnostic était de  $52 \pm 15$  ans avec une nette prédominance féminine (62%) (2). L'HTAP est généralement sévère sur le plan clinique et hémodynamique (2). En l'absence de traitement, la médiane de survie est de 2,8 ans (3).

#### 1.1.1.2 HTAP héritable

Des formes familiales (> 1 cas dans la famille) d'HTAP ont été identifiées depuis longtemps (4), soulignant une prédisposition génétique potentielle sous-jacente. Des mutations germinales de gènes codant pour des membres de la famille des récepteurs du TGF $\beta$  tels que BMPR-II (*Bone Morphogenic Protein Receptor type II*) ont été mises en évidence chez certains de ces patients (5, 6). D'autres mutations ont été identifiées sur les gènes codant pour d'autres récepteurs de la superfamille du TGF $\beta$  tels *activin-like kinase-type 1* (ALK1) (7) et *endoglin* (8). Elles sont transmises par mode autosomique dominant. La pénétrance est toutefois faible (10-20 %) si bien que la majorité des sujets porteurs de la mutation ne développera jamais la maladie (9). Des mutations de BMPR-II sont retrouvées dans près de 70% des cas d'HTAP familiale mais également chez 10 à 30 % des cas d'HTAP idiopathiques apparemment non familiales. C'est la raison pour laquelle le terme d'HTAP « familiale » a été remplacé dans la dernière version de la classification des HTP par le terme « héritable » (1). Sur le plan clinique, les patients souffrant d'HTAPi et d'HTAP héritable ont une présentation clinique similaire. Toutefois, les HTAP héritables ont des paramètres

hémodynamiques un peu plus sévères au moment du diagnostic et répondent plus rarement aux vasodilatateurs en aigu (10-12). Ils ont toutefois une survie globale similaire (12). Enfin le phénomène d'anticipation génétique mis en évidence, c'est-à-dire un âge de plus en plus jeune au moment du diagnostic d'HTAP au fil des générations des patients, est actuellement débattu car il pourrait résulter de biais (9).

#### *1.1.1.3 HTAP associée à la prise d'anorexigènes*

Un lien possible entre l'exposition aux anorexigènes et le développement d'HTAP a été soulevé dans les années 1960, lorsqu'une augmentation dramatique des cas d'HTAP a été rapportée en Suisse après la mise sur le marché d'un anorexigène : le fumarate d'aminorex (13). Les études épidémiologiques ont démontré qu'environ 2-3 % des sujets exposés à cette substance développaient une HTAP mais que surtout 61% des 582 patients, chez qui une HTAP avait été diagnostiquée, avaient été exposés au fumarate d'aminorex (13). Deux larges études épidémiologiques ont démontré une association entre l'exposition aux dérivés de la fenfluramine et la survenue de l'HTAP (14, 15). Le risque de développer une HTAP semble relié à la durée d'exposition (risque relatif estimé à 23,1 (IC95% 6,9-77,7) pour une durée > 3 mois) (14) et décroît après l'arrêt mais peut survenir plusieurs années après la fin de l'exposition. La présentation clinique de ces patients est en tout point comparable à l'HTAP idiopathique (mutations BMPR-II identifiées, sévérité clinique et hémodynamique, pronostic) (2). Sa physiopathologie, bien que mal comprise, pourrait impliquer des anomalies du métabolisme de la sérotonine. D'autres toxiques, notamment les amphétamines, augmentent également le risque de développer une HTAP.

#### *1.1.1.4 HTAP associée aux connectivites*

Les connectivites représentaient la 2<sup>ème</sup> condition associée dans le registre français (15,3%) (2). Elle peut être la conséquence d'une atteinte fibrosante pulmonaire spécifique mais peut également survenir en l'absence de pathologie interstitielle pulmonaire significative. C'est alors l'atteinte isolée des vaisseaux pulmonaires qui est à l'origine de l'élévation des pressions pulmonaires. Plus rarement, une atteinte myocardique spécifique est en cause. La sclérodermie systémique, et principalement sa forme cutanée limitée, est la connectivite qui se complique le plus fréquemment d'HTAP. Deux études de registre récentes retrouvent une prévalence de l'HTAP associée à la sclérodermie variant entre 7,8 et 12% justifiant un dépistage échographique annuel dans cette population (16, 17). Cliniquement, cette forme est en général sévère et de pronostic sombre (18). La réponse aux traitements spécifiques (prostacycline...) semble moins bonne (19). De rares cas d'amélioration sous immunosuppresseurs ont été rapportés dans l'HTAP associée au lupus et aux connectivites mixtes (20, 21).

#### *1.1.1.5 HTAP associée aux cardiopathies congénitales avec shunt droit-gauche*

Le terme de syndrome d'Eisenmenger désigne communément tous les cas d'HTAP induite par des shunts qui font communiquer les circulations pulmonaire et systémique (1). La classification actuelle des cardiopathies congénitales prend en compte le type, la taille, ainsi que la correction (spontanée ou chirurgicale) des anomalies congénitales documentées (1). Ces caractéristiques sont importantes puisqu'elles influencent directement le risque de développer une HTAP. Ce risque est effectivement plus élevé en présence d'une communication interventriculaire ( $\approx 10\%$ ) comparativement à une communication interauriculaire ( $\approx 4-6\%$ ) (22). De même, certains types de communications interauriculaires

seront plus fréquemment compliqués d'HTAP (23). Enfin, le développement de l'HTAP est fonction de la taille de l'anomalie, survenant chez  $\approx 3\%$  et  $\approx 50\%$  des patients avec communications interventriculaires de petite taille ou de taille  $> 1,5\text{ cm}$ , respectivement (24). A la phase initiale de la maladie, le flux sanguin systémique à haute pression (shunt gauche-droit) entraîne des lésions de remodelage dans le lit vasculaire pulmonaire à l'origine d'une augmentation progressive mais continue des résistances vasculaires pulmonaires jusqu'à obtenir un shunt bidirectionnel ou inversé (droit-gauche) lorsque leur valeur excède les résistances systémiques (25). Comparativement à l'HTAP idiopathique, les complications hémorragiques (hémoptysies, hémorragie intracrânienne) et thrombotiques (thrombus d'alluvionnement, embolie paradoxale) sont plus fréquentes en présence d'une cardiopathie congénitale mais le pronostic à long terme est plus favorable.

#### *1.1.1.6 HTAP associée à l'hypertension portale*

Décrite pour la première fois en 1951 par Mantz et Craige, l'association HTAP et hypertension portale est reconnue sous le nom d'hypertension porto-pulmonaire (26). Le développement de cette HTAP est en relation avec l'hypertension portale et peut survenir en l'absence de maladie hépatique (thrombose du tronc porte) (27). Il n'y a aucun lien entre la sévérité de l'atteinte hépatique ou le niveau d'hypertension portale et le risque de développer une HTAP (27). La prévalence de l'hypertension porto-pulmonaire est de 2% (28) mais semble plus élevée chez les malades en attente de transplantation hépatique (de 3,5 à 8,5%) (29, 30). Comparativement à l'HTAP idiopathique, l'hypertension porto-pulmonaire se caractérise par un sex ratio inversé (60% d'hommes) et une sévérité hémodynamique un peu moindre (index cardiaque plus élevé) (2) (31). Enfin, la présence d'une HTAP sévère (PAP

moyenne > 35 mmHg et résistances vasculaires pulmonaires > 250 dynes.s.cm<sup>-5</sup>) est une contre-indication formelle à la transplantation hépatique (32).

#### *1.1.1.7 HTAP associée à l'infection par le VIH*

Depuis 1987, date à laquelle le premier cas d'HTAP diagnostiquée chez un patient séropositif pour le VIH a été publié (33), plus de 200 nouveaux cas ont été rapportés (34). La prévalence de l'HTAP associée à l'infection par le VIH est de l'ordre de 0,5% (35). De façon intéressante, les résultats d'une étude récente de registre multicentrique française ayant inclus près de 8000 patients VIH+ démontre que cette prévalence reste stable (0,46% IC95% 0,32-0,64) malgré la généralisation des associations antirétrovirales (36). La physiopathologie de cette atteinte reste mal comprise. Une action directe du virus n'a pu être démontrée et on suppose qu'il agirait indirectement via des cytokines et des facteurs de croissance. La survenue de cette complication est indépendante du niveau d'immunodépression et du mode de contamination mais aggrave significativement le pronostic de ces patients qui décèdent le plus souvent de défaillance cardiaque droite et non de complications infectieuses opportunistes (37). L'amélioration de la survie de ces patients coïncide avec les progrès dans la prise en charge thérapeutique (prostacycline, bosentan, antirétroviraux) (37-39).

#### *1.1.1.8 HTAP associée à la bilharziose*

L'HTAP associée à la bilharziose a été ajoutée au groupe de cette nouvelle classification en raison d'une présentation clinique et de données histopathologiques similaires à celles retrouvées au cours de l'HTAPi. La bilharziose est la 3ème cause d'infection parasitaire dans le monde avec plus de 300 millions d'individus infectés. La maladie est liée à la pénétration cutanée de larves de *Schistosoma* qui vont migrer par voie sanguine aux poumons puis vers

le foie, l'intestin ou la vessie. Les vers adultes vont se reproduire sous forme d'œufs majoritairement excrétés mais dont certains vont persister dans l'organisme notamment au niveau hépatique. L'infection chronique à *Schistosoma* entraîne une fibrose périportale, une hypertension portale à l'origine de l'ouverture de shunts porto-systémiques à travers lesquels les œufs vont migrer et être bloqués au niveau du filtre pulmonaire. Les œufs de bilharzie créent une intense réaction inflammatoire granulomateuse vasculaire pulmonaire qui pourrait finalement aboutir à la constitution d'une HTAP. Les mécanismes physiopathologiques précis à l'origine de cette HTAP ne sont pas bien connus et pourraient inclure l'hypertension portale, une complication fréquente de cette infection parasitaire, et une inflammation vasculaire locale causée par les œufs de schistosoma. La prévalence de l'HTAP était de 4.6% chez les patients ayant une forme hépato-splénique dans une étude récente avec cathétérisme cardiaque (40).

#### *1.1.1.9 HTAP associée aux anémies hémolytiques chroniques*

Plusieurs études ont rapporté qu'une HTAP pouvait compliquer l'évolution des anémies hémolytiques chroniques acquises ou héréditaires telles la drépanocytose (41), les thalassémies (26), la sphérocytose et la stomatocytose héréditaires (1). Au cours des anémies hémolytiques chroniques, c'est la consommation élevée en NO conduisant à une inactivation de la voie du GMPc dans les cellules musculaires lisses vasculaires qui semble impliquée dans la survenue d'une HTAP. Néanmoins, il existe des causes variées d'élévation de la PAPm au cours de la drépanocytose et des études sont actuellement en cours pour définir les mécanismes des HTAP observées.

### 1.1.2 Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire

Malgré certaines similitudes partagées avec l'HTAPi, la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hémangiomatose capillaire ont été individualisées dans un sous-groupe (1). En effet, ces deux entités se caractérisent par un remodelage affectant les veinules ou les capillaires pulmonaires et se distinguent de l'HTAPi par un plus mauvais pronostic et certaines spécificités thérapeutiques (42, 43). Toute la sévérité de cette atteinte réside dans le risque d'aggravation, parfois mortelle, de cet oedème pulmonaire sous traitement vasodilatateur (44). Le diagnostic formel repose sur la biopsie pulmonaire qui n'est pas dénuée de risque chez ces patients. Une approche diagnostique non invasive est donc indispensable et fait appel au scanner thoracique. La présence et spécialement l'association d'épaississement des septas interlobulaires, de nodules centro-lobulaires, d'adénopathies médiastinales et d'épanchement pleural sont des anomalies scannographiques très suggestives de MVOP ou HCP (45). L'existence de ces anomalies chez un patient présentant une HTAP doit faire compléter le bilan par la réalisation d'un lavage bronchoalvéolaire qui mettra en évidence une hémorragie alvéolaire occulte avec présence de sidérophages (46).

### 1.1.3 Hypertension pulmonaire associée à une cardiopathie gauche

L'élévation de la pression veineuse pulmonaire au delà de 15 mmHg liée à une myocardiopathie ou une valvulopathie gauche entraîne une élévation passive des pressions dans l'ensemble de la circulation pulmonaire. Les résistances vasculaires pulmonaires sont, dans cette situation, normales (<3.0 Unités Wood) et il n'existe pas de gradient entre la PAPm et la PAPO (gradient transpulmonaire < 12 mmHg). Toutefois, certains patients avec une insuffisance cardiaque gauche présentent une élévation de la PAP disproportionnée par rapport à l'élévation des pressions dans les cavités cardiaques gauches (gradient transpulmonaire > 12 mmHg) et une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires

(> 3 Unités Wood). Cette proportion atteindrait 19% à 35% des patients adressés pour bilan pré-greffe cardiaque (47, 48). L'échocardiographie est l'examen complémentaire de choix et permet d'analyser les performances contractiles du ventricule gauche et l'intégrité de l'appareil valvulaire. Le cathétérisme cardiaque droit met en évidence une HTAP post-capillaire (pression artérielle pulmonaire d'occlusion > 15 mmHg). La prise en charge thérapeutique consiste en l'administration de traitements améliorant la contractilité ventriculaire gauche et/ou à la correction d'anomalie valvulaire.

#### 1.1.4 Hypertension pulmonaire associée aux affections respiratoires et/ou à l'hypoxie

Dans cette catégorie, c'est l'hypoxémie chronique due à une maladie du parenchyme pulmonaire (fibrose ou emphysème), une hypoventilation alvéolaire d'origine centrale ou un séjour prolongé en haute altitude qui est responsable de l'hypertension pulmonaire. Il s'agit d'une hypertension en règle générale modérée. Le niveau de PAP moyenne n'excède en général pas 35 mmHg avec un débit cardiaque normal. Toutefois, une minorité de patients peut développer une hypertension pulmonaire beaucoup plus sévère ou disproportionnée par rapport au degré d'insuffisance respiratoire (49). L'oxygénothérapie de longue durée (> 16h/jour) est le traitement de référence et améliore la survie des patients atteints de bronchopathie chronique obstructive.

#### 1.1.5 Hypertension pulmonaire secondaire à une maladie thromboembolique chronique

L'hypertension pulmonaire post-embolique est liée à la persistance et l'organisation fibreuse de caillots fibrino-cruoriques après une ou plusieurs embolies pulmonaires (50). Un remodelage de la microcirculation pulmonaire, en tout point similaire à celui observé dans l'HTAP idiopathique, se développe dans les territoires non occlus et s'associe à l'obstruction liée aux caillots fibreux pour entraîner une augmentation des résistances vasculaires



pulmonaires à l'origine d'une défaillance progressive du ventricule droit (51). Des séries anciennes rapportent une incidence entre 0,1 et 0,5% parmi les patients survivants à une embolie pulmonaire aiguë (52). Cependant une étude récente ayant suivi prospectivement des patients après un épisode d'embolie pulmonaire aiguë rapporte des incidences nettement plus élevées à 3,1% à 1 an et 3,8% à 2 ans (53). Le pronostic de cette affection s'est considérablement transformé grâce au développement de l'endartérectomie pulmonaire (54). Elle représente actuellement la seule forme curable d'hypertension pulmonaire. La scintigraphie pulmonaire de ventilation et perfusion est l'examen décisif qui permet d'affirmer la nature post-embolique de l'HTAP. Elle met en évidence des défauts perfusionnels systématisés habituellement bilatéraux sans anomalie ventilatoire associée. L'angiographie pulmonaire associée à l'angioscanner thoracique confirme le diagnostic et détermine en fonction du siège proximal ou distal des lésions les possibilités d'endartérectomie pulmonaire. Dans les formes distales inopérables, un traitement spécifique de l'HTAP (bosentan) associé à l'anticoagulation a donné des résultats intéressants (55).

#### 1.1.6 Hypertension due à un ou plusieurs mécanismes

Des pathologies variées constituant des causes rares d'HTP sont maintenant individualisées et sont regroupées dans ce 5<sup>ème</sup> groupe qui inclut également les HTP dues à une compression extrinsèque des vaisseaux pulmonaires par des adénopathies, des tumeurs ou une fibrose médiastinale.

**Tableau 1** : classification des hypertensions pulmonaires (Dana Point, 2008) (1)

**1. Hypertension artérielle pulmonaire**

- HTAP idiopathique
- HTAP Héritable
- HTAP associée à la prise de toxiques et de drogues (anorexigènes...)
- HTAP associée à
  - Connectivites
  - Hypertension portale
  - Infection par le virus de l'immunodéficience humaine
  - Cardiopathies congénitales avec shunts gauche-droits
  - Bilharziose
  - Anémies hémolytiques chroniques (drépanocytose...)
- HTAP persistante du nouveau-né

**2. Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomatose capillaire**

**3. Hypertension pulmonaire due à une maladie du coeur gauche**

- Dysfonction systolique
- Dysfonction diastolique
- Valvulopathies gauches

**4. Hypertension pulmonaire due à une pathologie respiratoire chronique et/ou une hypoxémie**

- Broncho-pneumopathie chronique obstructive
- Pneumopathies interstitielles
- Syndrome d'apnée du sommeil
- Hypoventilations alvéolaires
- Exposition prolongée à la haute altitude
- Anomalies du développement

**5. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique**

**6. Hypertension pulmonaire due à un ou plusieurs mécanismes**

- Maladies hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie
- Maladies systémiques : sarcoïdose, Histiocytose X, lymphangioléiomyomatose, neurofibromatose, vascularite
- Affections métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies
- Autres : médiastinites fibreuses, insuffisance rénale chronique, obstruction tumorale

## **1.2 Anatomie pathologique**

L'hypertension artérielle pulmonaire « proliférante » est une maladie de la microcirculation pulmonaire caractérisée par un remodelage de la partie distale résistive du lit vasculaire pulmonaire. Les lésions caractérisant l'HTAP sont en effet localisées au niveau des artérioles musculaires mesurant moins de 500µm de diamètre. Ces lésions associent une hypertrophie concentrique de l'intima dite « en bulbe d'oignon », une hypertrophie de la média, des lésions dites plexiformes et des microthromboses. Elles entraînent un épaissement de la paroi vasculaire conduisant à une oblitération progressive des artérioles à l'origine de l'augmentation des résistances à l'écoulement qui aboutit à une défaillance cardiaque droite. Parfois, ce remodelage affecte principalement soit les veinules pulmonaires, soit les capillaires. On parle, dans ce cas, de maladie veino-occlusive ou d'hémangiomatose capillaire pulmonaires.

### **1.2.1 Fibrose intimale concentrique**

L'analyse immunohistochimique révèle une organisation radiaire de fibroblastes, myofibroblastes et myocytes qui prennent un aspect dit en bulbe d'oignons. Ce remodelage fibrosant est souvent associé à des lésions plexiformes et à des cas d'HTAP associées à des connectivites (56).

### **1.2.2 Fibrose intimale excentrique et lésion thrombotique**

Contrairement à la lésion précédemment décrite, cette lésion n'est pas stratifiée. Elle est constituée principalement de fibroblastes et de matrice collagène. Les formes excentriques de ce remodelage sont souvent attribuées à des événements thrombotiques qui peuvent être régulièrement observés dans l'HTAP. De telles lésions sont souvent constatées chez des patients présentant des antécédents d'embolie pulmonaire. Cependant, une maladie

thromboembolique n'est pas une condition préalable au développement de telles lésions. Une prolifération intimale de fibroblastes peut également être provoquée par une expression accrue de facteurs de croissance dont l'expression peut être induite par les forces de cisaillement (*shear-stress*). Enfin, des processus thrombotiques *in situ* sont souvent rencontrés au cours de l'HTAP. L'oblitération de la lumière de l'artériole par un thrombus présentant de multiples lumières de recanalisation donne un aspect particulier de lésion en passoire.

### 1.2.3 Hypertrophie de la média

Cette lésion est fréquemment rencontrée dans divers sous-groupes d'HTAP et est liée à la prolifération de cellules musculaires lisses de la média dans le cadre d'une réponse non spécifique à un stimulus pathologique comme par exemple l'hypoxie. L'hypertrophie de la média est le plus souvent associée à d'autres modifications de la paroi artérielle pulmonaire. Elle représenterait une modification précoce de la structure de la paroi vasculaire. Son caractère réversible en l'absence d'altérations fibrosantes étaye cette hypothèse.

### 1.2.4 Lésions complexes

On distingue trois types de lésions :

- *La lésion plexiforme* a longtemps été considérée comme une caractéristique spécifique des HTAP idiopathiques (57) mais elle a été depuis décrite dans d'autres formes d'HTAP (associée à la prise d'anorexigènes, aux connectivites ou à l'infection par le VIH) (56). Cette lésion est formée par la prolifération exubérante de cellules endothéliales et de myofibroblastes, formant des canaux microvasculaires endoluminaux dans une matrice oblitérante riche en collagène (58). La lésion principale est le plus souvent suivie d'une dilatation sinusoïdale surnommée lésion

de dilatation. Ces modifications vasculaires pathologiques touchent typiquement les petites artères lobulaires ou encore les bifurcations des artères dites supra-numéraires.

- *Les lésions de dilatation* décrites précédemment peuvent également apparaître de façon prédominante. Toutefois, elles sont le plus souvent étroitement liées à la présence de lésions plexiformes (59).
- *Les lésions d'artérite* caractérisées par la présence d'une nécrose fibrinoïde de la paroi artérielle, sont plutôt rares au cours de l'HTAP. En revanche, il n'est pas rare de retrouver des infiltrats inflammatoires périvasculaires constitués de lymphocytes T et de macrophages. Leur implication dans la physiopathologie de l'HTAP demeure mal précisée.

#### 1.2.5 Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP)

Il s'agit d'un remodelage intimal fibreux, souvent lâche, parfois plus dense en présence de cellules  $\alpha$ -actine positives qui siège au niveau du système veineux pulmonaire. Ces lésions sont souvent accompagnées d'un remodelage artériel pulmonaire intimal et médial mais ne sont jamais associées à des lésions plexiformes (59). Il existe très souvent une hémorragie intraalvéolaire secondaire au blocage du lit pulmonaire veineux qui représente un indice diagnostique important de la MVOP (46).

#### 1.2.6 Hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP)

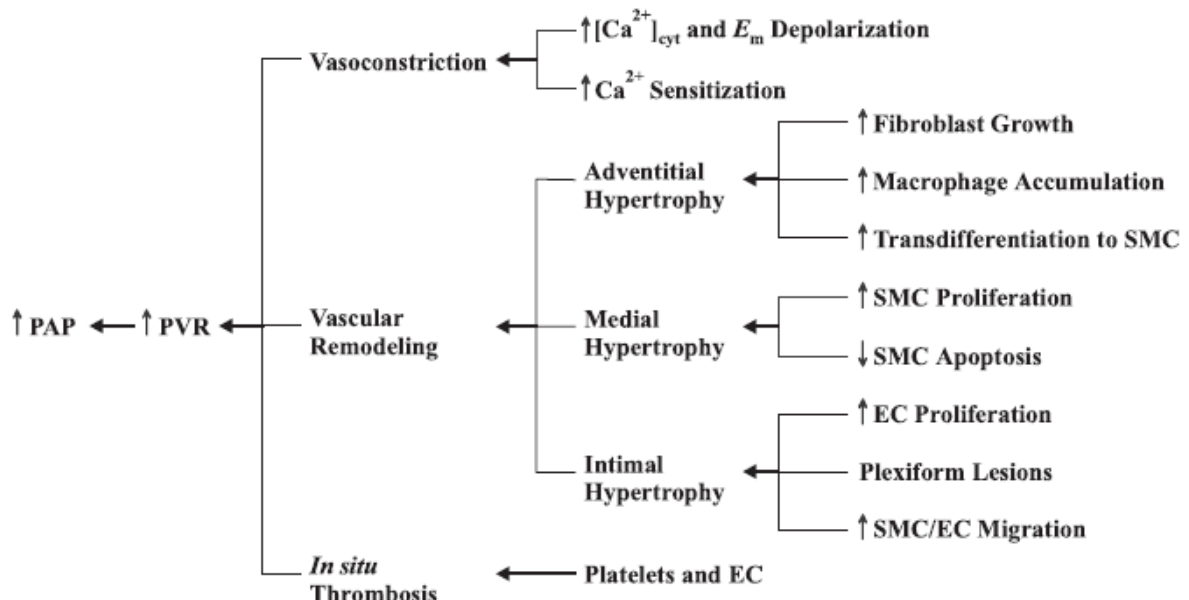
Cette forme très rare d'HTAP est difficile à distinguer cliniquement de la MVOP. Il existe une prolifération capillaire massive, souvent « en taches ». La présence d'un doublement des couches endothéliales capillaires des deux côtés de la cloison alvéolaire est un critère histologique important parfois exigé pour différencier la MVOP de la prolifération capillaire

« réactive » parfois rencontrée au cours des hypertensions pulmonaires post-capillaires. Comme dans le cas d'une MVOP, ces lésions peuvent entraîner un blocage veineux pulmonaire à l'origine d'une hémorragie intra-alvéolaire.

### 1.3 Aspects cellulaires

L'HTAP représente une pan-vasculopathie au cours de laquelle chaque type cellulaire (cellules endothéliale, musculaire lisse, fibroblaste) constituant la paroi vasculaire joue un rôle spécifique dans la réponse à l'agression (Figure 1).

**Figure 1 :** Mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'élévation des résistances vasculaires pulmonaires (PVR) et la pression artérielle pulmonaire au cours de l'HTAP. (d'après (60))



### 1.3.1 Cellule endothéliale

La cellule endothéliale occupe une place stratégique entre la lumière vasculaire et le reste de la paroi vasculaire. Elle forme une barrière semi-perméable impliquée dans la régulation du tonus vasculaire, de la coagulation, des passages cellulaires et des transferts de fluides entre les compartiments intra et extra-vasculaires. Elle produit différents facteurs de croissance agissant par effet autocrine et paracrine. Enfin, elle dégrade et inactive certains facteurs vasoconstricteurs circulants. A l'état activé par différents états pathologiques, elle peut exprimer différents marqueurs spécifiques tels E-selectine, l'*intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, le facteur tissulaire, et le récepteur au *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Ces modifications contribuent à une augmentation de la coagulabilité, la prolifération et la vasoconstriction.

Au cours de l'HTAP, les cellules endothéliales présentent un phénotype anormal conduisant à une prolifération anormale à l'origine de la constitution des lésions plexiformes (56). Cool et coll ont ainsi démontré, à l'aide de techniques immunohistochimique et de reconstruction en 3 dimensions, que les cellules endothéliales issues des lésions plexiformes exprimaient intensément le récepteur KDR pour le VEGF et présentaient une diminution de l'expression de p27/kip1, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire (56). D'autres marqueurs de l'angiogenèse tels que le VEGF et les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'*hypoxia inducible factor* (HIF-1) sont également exprimés par les cellules endothéliales isolées à partir de lésions plexiformes (61). De plus, les cellules qui composent les lésions plexiformes des HTAP idiopathiques auraient une origine monoclonale (62). Bien que la genèse de ces lésions comporte probablement une composante hémodynamique, celles-ci pourraient représenter bien plus que la simple conséquence d'une élévation de la pression intravasculaire et pourrait être un marqueur d'une anomalie endothéliale fondamentale au cours de l'HTAP idiopathique. Des

défauts de gènes suppresseurs de croissance ont été découverts dans les lésions plexiformes de patients atteints d'HTAP idiopathique, incluant le récepteur de type 2 du TGF $\beta$  et dans le gène proapoptotique *Bax* (63). Ces mutations somatiques pourraient ainsi permettre l'expansion clonale des cellules endothéliales contribuant à la formation des lésions plexiformes et à l'oblitération vasculaire. Le stimulus initiateur ou le facteur déclenchant restent inconnus mais pourraient être l'hypoxie alvéolaire, les contraintes de cisaillement (*shear stress*), l'inflammation ou la réponse à des drogues (dexfenfluramine...) ou des agents pathogènes (virus herpès humain de type 8 (HHV8)...) dans un contexte de susceptibilité génétique. Cette agression peut altérer non seulement la prolifération cellulaire et l'apoptose mais également les fonctions homéostatiques de la cellule endothéliale incluant la régulation de l'hémostase et une dérégulation de la balance facteurs vasoconstricteurs/pro-proliférants et vasodilatateurs/anti-proliférants en faveur d'un excès des premiers et d'une diminution des seconds (64).

### 1.3.2 Cellule musculaire lisse

La prolifération exagérée des cellules musculaires lisses aboutissant à l'obstruction des vaisseaux pulmonaires de petit calibre justifie l'intérêt porté à ce type cellulaire. De nombreux travaux ont cherché à mieux caractériser la cellule musculaire lisse des vaisseaux pulmonaires et à reproduire, sur des cellules en culture ou des fragments de vaisseaux isolés, les altérations observées *in situ*. Ces études ont porté non seulement sur les facteurs paracrines et autocrines qui contrôlent la prolifération et la contraction de la cellule musculaire lisse mais aussi sur les propriétés intrinsèques de cette cellule. Frid et coll ont décrit dans la paroi des artères pulmonaires bovines au moins 4 couches correspondant à 4 phénotypes de cellules musculaires lisses (L1, L2, L3i et L3C). Ces cellules sont différemment



orientées dans la média et se distinguent, d'une part, par des différences d'expression de protéines du cytosquelette ( $\alpha$ -actine, myosine, calponine, desmine et meta-vinculine) et, d'autre part, par leur capacité à proliférer en réponse à divers facteurs de croissance et l'hypoxie (65). Dans l'espèce humaine, cette hétérogénéité s'observe dans les cellules musculaires lisses isolées à partir de différents sites anatomiques (artères pulmonaires proximales ou distales). Ainsi, les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires distales (<1 mm de diamètre) prolifèrent plus que les cellules proximales (> 8 mm de diamètre) et sont plus sensibles à l'effet antiproliférant d'analogues de la prostacycline (66). De nombreux facteurs sont impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires incluant les mutations ou régulation négative de l'expression de BMPR-II (67, 68), des anomalies du métabolisme des mitochondries, l'expression *de novo* de protéines anti-apoptotique telle la survivine (69) (70), l'augmentation de l'expression et de l'activité du transporteur de la sérotonine (5HTT) (71), l'augmentation de l'expression et de l'activité du récepteur au *platelet derived growth factor* (PDGF) (72), et une diminution de l'expression des canaux potassiques voltages dépendants, Kv 1.5 (73, 74). La perte sélective de ces canaux Kv entraîne une dépolarisation des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires, augmente la concentration de calcium intracellulaire et conduit à la fois à une vasoconstriction et à une prolifération cellulaire.

### 1.3.3 Fibroblaste

L'une des caractéristiques de l'hypertension pulmonaire sévère est la formation d'une couche de myofibroblastes et de matrice extracellulaire entre l'endothélium et la limitante élastique externe appelée néo-intima. Au cours du modèle hypoxique, les fibroblastes adventitiels semblent être les premières cellules activées et impliquées dans un mécanisme de prolifération et de synthèse de matrice extracellulaire en réponse au stimulus

hypertensif (75). Les mécanismes impliqués dans la migration des fibroblastes dans la media et l'intima sont inconnus. Une surexpression de métalloprotéases (MMP2 et 9) pourrait en partie expliquer ce phénomène (76).

#### 1.3.4 Plaquettes

Des lésions thrombotiques sont fréquemment mises en évidence chez les patients souffrant d'HTAP (77, 78). Il s'agit de lésions de fibrose intimale excentrique suggérant une organisation d'anciens thrombi. Ces lésions peuvent aboutir à une occlusion complète de la lumière vasculaire et participent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. La présence de ces lésions d'artériopathie thrombotique est associée à l'âge et à la durée de la maladie mais n'est pas spécifique du type d'hypertension pulmonaire (79). Ces lésions de thrombose *in situ* peuvent être déclenchées par des anomalies de la cascade de la coagulation et du système fibrinolytique, la dysfonction endothéliale et/ou l'activation des plaquettes. Une élévation des taux plasmatiques de fibrinopeptide A, un marqueur de la génération de thrombine, a été mise en évidence chez 31 patients souffrant d'HTAP idiopathique (80). Le système fibrinolytique est également affecté : une élévation du taux plasmatique de *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), un inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), et une baisse de la thrombomoduline soluble plasmatique ont été rapportées au cours de l'HTAP idiopathique (80, 81). Le facteur von Willebrand, synthétisé par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes et les plaquettes, est une protéine essentielle dans les interactions entre la cellule endothéliale et les plaquettes. Des taux circulants et une activité *in vitro* élevés de facteur von Willebrand ont été mis en évidence au cours de l'HTAP (82).

## ***1.4 Aspects moléculaires impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire***

De nombreux facteurs sont impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Les progrès réalisés ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTAP ont focalisé l'attention sur l'implication de différentes voies de signalisation dans l'initiation ou la progression de la maladie. La plupart d'entre-elles ont conduit à des possibilités thérapeutiques ayant contribué à améliorer le pronostic des patients souffrant d'HTAP (83).

### ***1.4.1 Prostaglandines et récepteurs aux prostaglandines***

Sous l'action de la cyclo-oxygénase, l'acide arachidonique est converti en prostaglandine (Pg) H<sub>2</sub> qui constitue un substrat pour la Pgl<sub>2</sub> synthase et la thromboxane synthase. La Pgl<sub>2</sub> synthase est exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire et synthétise de la prostacycline (Pgl<sub>2</sub>) qui entraîne, après liaison à son récepteur et via l'AMPC, une relaxation des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires et inhibe leur prolifération et l'agrégation plaquettaire. La thromboxane synthase produit au niveau endothélial et plaquettaire du thromboxane A<sub>2</sub> qui stimule la vasoconstriction et l'activation plaquettaire. La dysfonction endothéliale et l'activation plaquettaire mises en évidence au cours de l'HTAP réduit la production de Pgl<sub>2</sub> et augmente celle de thromboxane A<sub>2</sub> (84, 85).

Les traitements fondés sur l'administration continue de Pgl<sub>2</sub> exogène ou de ses dérivés chez des patients souffrant d'HTAP améliorent les symptômes, les paramètres hémodynamiques et le pronostic (survie notamment) (86, 87). En revanche, l'administration d'un inhibiteur du thromboxane A<sub>2</sub> (terbogrel) n'a pas démontré son efficacité (88).

#### 1.4.2 Monoxyde d'azote (NO)

Le NO est synthétisé par 3 isoformes de la NO synthase (NOS) à partir de L-arginine. Schématiquement, ces trois isoformes, codées par 3 gènes distincts localisés sur les chromosomes 7,12 et 17, diffèrent entre elles par leur localisation cellulaire, leur fonction et leurs caractéristiques biochimiques. Les isoformes présentes dans les cellules endothéliales et nerveuses appartiennent à la famille des NOS constitutives, c'est-à-dire celles dont l'expression est normalement présente à l'état physiologique et permet la synthèse du NO respectivement en tant que médiateur paracrine de la relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire et en tant que neurotransmetteur. A l'inverse, l'isoforme macrophagique appartient à la famille des NOS inductibles c'est-à-dire celles dont l'expression, normalement absente à l'état physiologique, ne se manifeste que dans des états pathologiques tels le choc septique. Du fait de sa nature radicalaire, le NO est une molécule très instable car pouvant être facilement captée par les protéines à groupement prosthétique hémique, telle l'hémoglobine, et par l'O<sub>2</sub> et ses dérivés tel l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (89). Ceci explique la très brève durée de vie du NO et son action purement locale confinée au voisinage immédiat de son lieu de synthèse et de sécrétion.

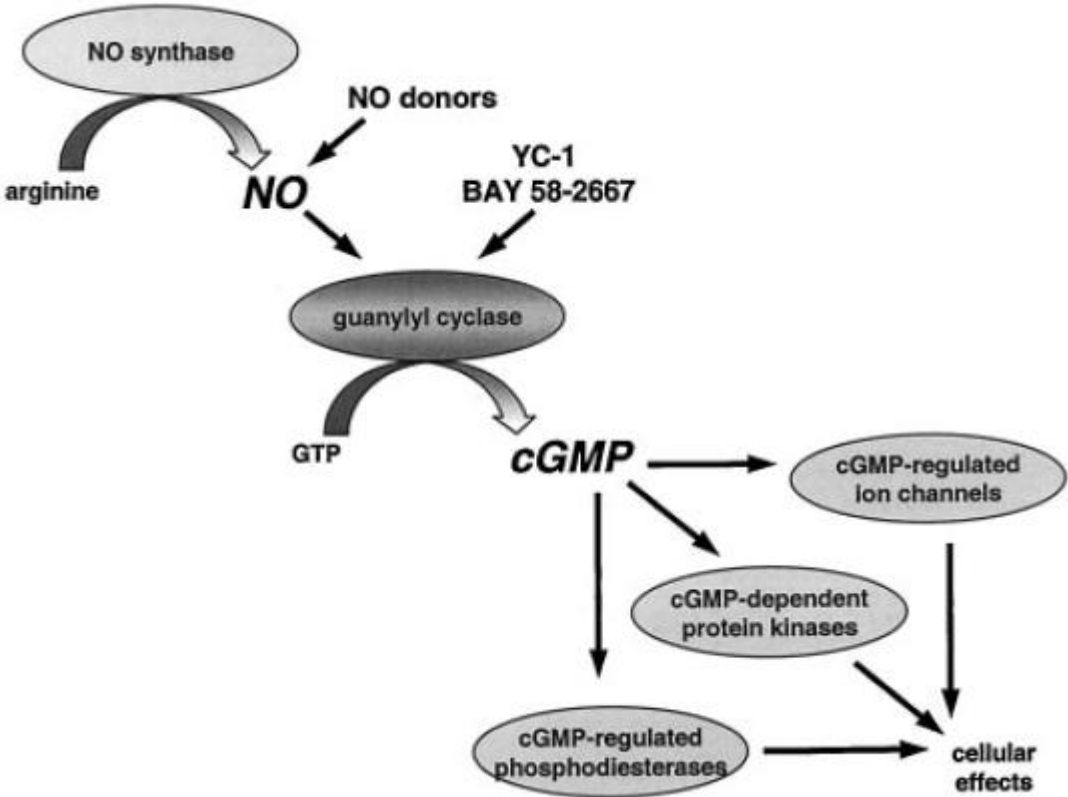
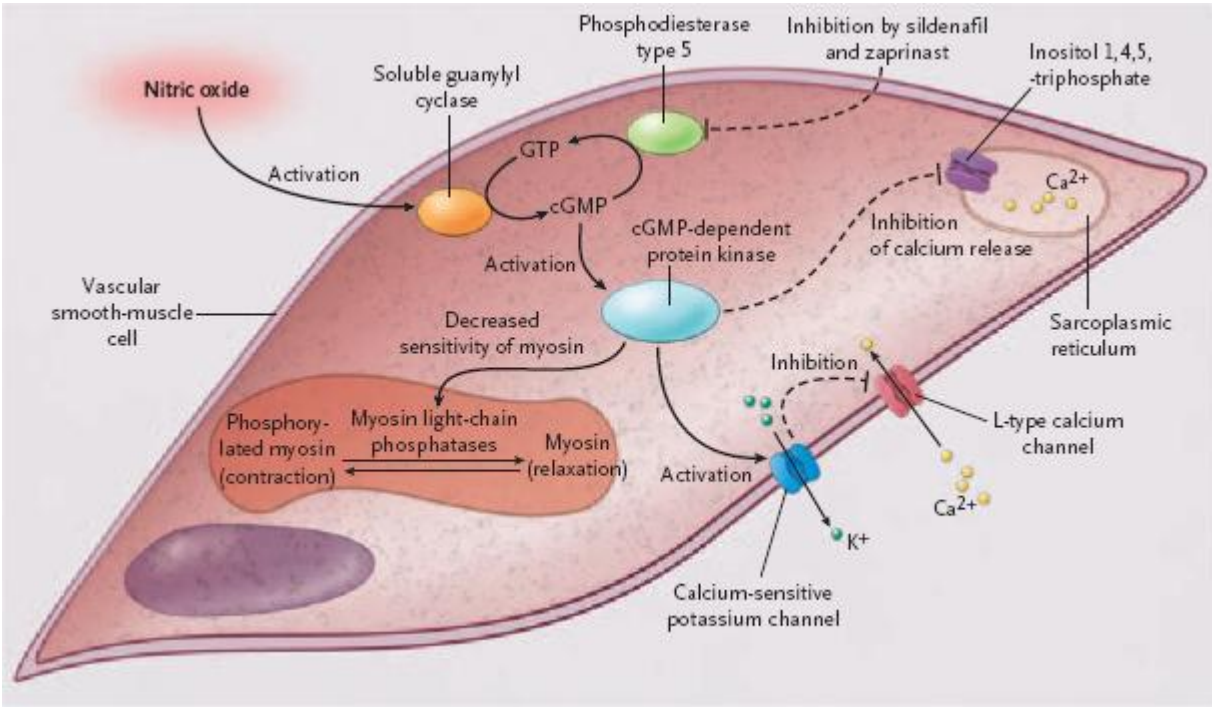
Le NO est produit au niveau vasculaire pulmonaire par la NOS endothéliale (NOS<sub>e</sub>) et diffuse dans les cellules musculaires lisses. L'effet relaxant musculaire lisse du NO se fait grâce à l'augmentation de la concentration intracellulaire d'un second messager nucléotidique le guanosine monophosphate cyclique (GMPc) liée à la stimulation de la guanylate cyclase soluble par le NO (90). On distingue 2 groupes de guanylate cyclase : les guanylates cyclases membranaires et les guanylates cyclases cytosoliques. Les premières sont des récepteurs membranaires des peptides natriurétiques (ANP, BNP), alors que les secondes sont des enzymes cytosoliques, représentées par les guanylates cyclases solubles, qui agissent

comme de véritables récepteurs intracellulaires du NO (91). La guanylate cyclase soluble est un hétérodimère composé de deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et l'expression des 2 sous-unités est indispensable pour l'activation de cette enzyme. Durant la période fœtale, cette enzyme est exprimée en grande majorité par la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire alors que son expression est quasiment inexistante dans la cellule endothéliale vasculaire pulmonaire. En revanche, la tendance inverse (augmentation de l'expression endothéliale et diminution dans les cellules musculaires lisses) s'opère dès la naissance et se maintient à l'âge adulte. Le NO se fixe directement sur l'hème (contenu dans la région amino-terminale) et permet une modification de conformation de l'enzyme et son activation. Cette stimulation est dite « dépendante du NO », mais la guanylate cyclase soluble peut être stimulée par d'autres molécules que le NO par liaison au niveau de la sous-unité  $\alpha$  (92). Une fois activée, la guanylate cyclase soluble catalyse la synthèse du GMPc à partir du GTP. Les effets cardiovasculaires du GMPc sont médiés par l'interaction avec au moins 3 groupes de protéines : les protéines kinases dépendantes du GMPc, les phosphodiésterases (PDE) impliquées, pour certaines d'entre-elles, dans la dégradation du GMPc, et les canaux ioniques couplés aux nucléotides cycliques (Figure 2) (90). La voie finale de l'activation de ces protéines kinases dépendant du GMPc est l'ouverture des canaux potassiques avec l'efflux du potassium hors de la cellule entraînant ainsi une hyperpolarisation de la membrane cellulaire, et la diminution de la concentration intracytosolique de calcium (91). La concentration intracellulaire de GMPc dépend d'une autre famille d'enzymes : les phosphodiésterases (PDE) dont l'une des isoformes (PDE5) est spécifique du GMPc en le transformant en GMP dépourvu d'effets sur les protéines activées par le GMPc.

De nombreux arguments expérimentaux suggèrent qu'il existe un tonus vasodilatateur physiologique basal sous la dépendance du NO reflétant l'activité de la NOSe aussi bien dans

la circulation pulmonaire que systémique (93). En effet, l'injection intraveineuse des inhibiteurs spécifiques de la NOS provoque l'augmentation immédiate de la pression artérielle pulmonaire. Ces molécules n'ayant aucune action sur le muscle lisse, cette augmentation de la pression artérielle est donc liée à une suppression de la synthèse du NO. La voie du NO est altérée de différentes façons au cours de l'HTAP. Ainsi, il a été mis en évidence une diminution de l'expression de la NOSe (94) et de la biodisponibilité du NO (95) au cours de l'HTAP. De plus, l'expression de la PDE5, enzyme impliquée dans l'hydrolyse du GMPc, est augmentée dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (96) et dans le ventricule droit (97) des patients souffrant d'HTAP. Enfin, la production d'inhibiteurs endogènes de la NOS, les diméthylarginines asymétrique et symétrique (ADMA et SDMA) est augmentée au cours de l'HTAP (98).

**Figure 2:** Régulation de la relaxation de la cellule musculaire lisse vasculaire par le NO et voie de signalisation du NO (d'après (90))



Cette voie physiopathologique est donc très logiquement la cible de différentes thérapeutiques ayant démontré leur efficacité ou en cours d'évaluation dans l'HTAP. Plusieurs inhibiteurs de PDE ont été testés. Dans la circulation pulmonaire, les PDE1 et PDE5 sont les cibles les plus intéressantes. Il existe 3 isoformes de la PDE1 qui sont régulées le complexe calcium-calmoduline et peut hydrolyser l'AMPc et le GMPc. L'expression des PDE1A et PDE1C est augmentée dans les artères pulmonaires des patients atteints d'HTAP (99). La perfusion d'inhibiteur de la PDE1 réduit les résistances vasculaires pulmonaires et l'hypertrophie ventriculaire droite dans des modèles animaux d'HTAP (99). L'expression de la PDE5 est augmentée dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires mais également dans les cardiomyocytes ventriculaire droit, dont ils sont physiologiquement absents, (97). Le sildenafil inhibe la PDE5 et améliore la contractilité du ventricule droit (97). L'efficacité du sildenafil et du tadalafil, autre inhibiteur de la PDE5, a été démontrée dans deux larges essais randomisés contre placebo et sont actuellement admis comme traitement de l'HTAP (100, 101).

La guanylate cyclase soluble, enzyme impliquée dans la production du GMPc, représente également une cible intéressante. Son expression est augmentée au cours de l'HTAP humaine et expérimentale (102). Il existe plusieurs activateurs de la guanylate cyclase soluble (92). Parmi ces différentes molécules, le BAY 63-2521 ou riociguat, disponible par voie orale, entraîne ainsi une augmentation de la synthèse de GMPc par la stimulation directe de la guanylate cyclase soluble. L'effet vasodilatateur du riociguat est indépendant du taux basal de NO, qui est abaissé au cours de l'HTAP, à la différence des inhibiteurs des PDE5. Cette molécule semble présenter un profil de tolérance favorable (103) et est actuellement en cours d'évaluation dans une étude de phase III.



### 1.4.3 Endothéline-1

#### 1.4.3.1 *Biosynthèse et dégradation des endothélines*

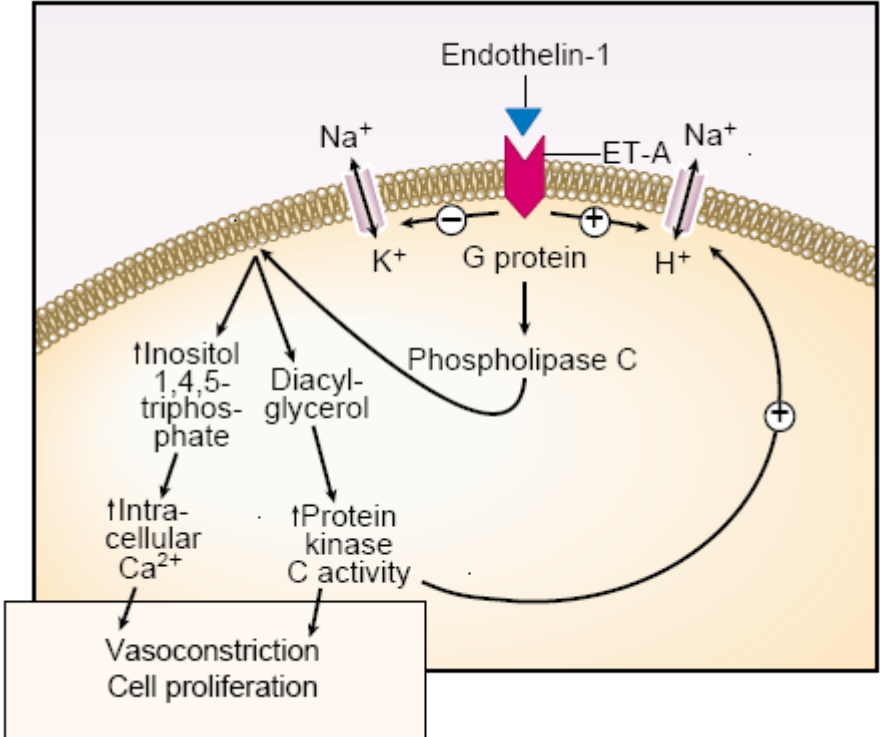
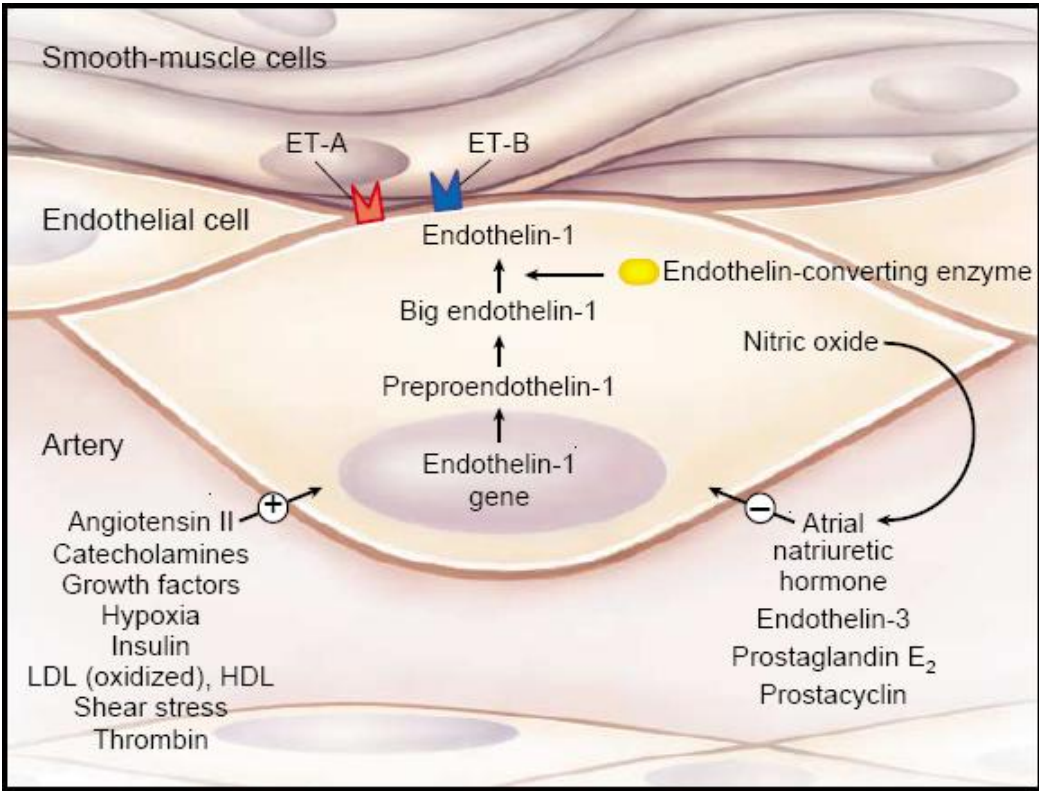
En 1988, Yanagisawa et coll ont décrit la structure en acides aminés d'un puissant vasoconstricteur produit par les cellules endothéliales qu'ils ont nommé endothéline. L'analyse du système endothéline a permis de caractériser deux autres gènes codant pour des peptides de structure comparable à celle de l'endothéline initialement décrite (104). Ces peptides ont été appelés ET-2 et ET-3 alors que l'endothéline initialement décrite a été baptisée ET-1 (104). Les trois isoformes ont une forte similitude en séquence d'acides aminés ne variant entre elles que de quelques résidus. ET-1, ET-2 et ET-3 diffèrent néanmoins par leur profil d'expression tissulaire et par leur affinité pour les récepteurs de l'endothéline. Les 3 isoformes de l'endothéline sont synthétisées sous forme de trois précurseurs différents, les pre-proendothélines (200 acides aminés) à partir de 3 gènes différents (Figure 3) (105). Ces précurseurs sont ensuite clivés par des endopeptidases de type furine en peptides de 38 acides aminés inactifs nommés proendothélines (ou big-endothélines) (105). Ces proendothélines seront à leur tour clivées par les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE-1 et ECE-2), spécifiques à chaque isoforme, en peptides de 21 acides aminés biologiquement actifs (105). Cette étape est physiologiquement importante puisque l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 est 140 fois supérieur à celui de son précurseur. Il a été identifié 4 isoformes de l'enzyme de conversion résultant d'un épissage différentiel d'un gène unique. L'ET-1 est principalement produite par les cellules endothéliales alors que les ET-2 et ET-3 sont également produites par d'autres types cellulaires (cellules épithéliales...).

L'ET-1 n'est pas stockée dans des vésicules de sécrétion à l'intérieur des cellules endothéliales. Cependant, la cascade de réactions aboutissant à l'excrétion d'ET-1 à partir du

gène pré-proET-1 s'effectue en quelques minutes permettant un ajustement très rapide de la production d'ET-1. L'ET-1 est principalement excrétée au pôle basal des cellules endothéliales en regard des cellules musculaires lisses suggérant un mécanisme d'action autocrine/paracrine.

La clairance de l'ET-1 de la circulation est très rapide. Après une injection intraveineuse d'ET-1 radioactive à un rat, la demi-vie biologique est d'une minute, toutefois les effets vasoconstricteurs sont maintenus pendant 1 heure (106, 107). Une grande partie de l'ET-1 circulante est retenue par le poumon. La circulation pulmonaire a la capacité de dégrader l'ET-1 par une action mettant en jeu le récepteur ET-B. Après un seul passage dans la circulation pulmonaire, la concentration d'ET-1 circulante diminue de 50% (108). La dégradation de l'endothéline se fait en deux étapes par une endopeptidase neutre, sensible au phosphoramidon ; l'ET-1 est clivée au site Ser5-Leu6, produisant un peptide encore actif, puis est inactivée par un clivage entre Asp18-Ile19.

**Figure 3:** Biosynthèse et récepteurs de l'endothéline (d'après (105))



#### *1.4.3.2 Lieux et régulation de la synthèse de l'endothéline*

L'ET-1 a été initialement mise en évidence au niveau des cellules endothéliales d'aorte de porc, puis a ensuite été retrouvée dans le rein et les poumons de porc, de rat et enfin chez l'Homme (105). Ce peptide est également présent dans le placenta humain et en quantité moindre dans d'autres tissus (aorte, cœur, cortex cérébral, hypothalamus, foie et rate) (105). Les ET-1 et ET-2 ont une distribution plus large que l'ET-3 qui est principalement retrouvée dans le système nerveux central et le tube digestif. Les cellules endothéliales sont le lieu principal de synthèse de l'ET-1 (105). Le peptide se comporte plus comme un facteur autocrine et paracrine qu'endocrine. Seule une petite portion d'ET-1 est détectée dans le plasma.

Dans les cellules endothéliales, la régulation de l'expression des gènes se situe à un niveau transcriptionnel. Elle peut être induite par l'ET-1 elle-même, l'angiotensine II, les catécholamines, la thrombine, les facteurs de croissance, des cytokines, les radicaux libres, l'insuline, l'hypoxie et les forces d'étirement (105). La synthèse d'ET-1 est inhibée par le NO, les peptides natriurétiques, l'héparine et les prostaglandines. (105).

#### *1.4.3.3 Récepteurs à l'endothéline*

Les trois isoformes de l'endothéline agissent en se liant à des récepteurs membranaires dont il existe deux types distincts : ET-A et ET-B (figure 3). Ils appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'affinité de l'ET-1 pour le récepteur ET-A est 100 fois supérieure à celle de l'ET-3 alors que les 3 isoformes ont la même affinité pour le récepteur ET-B. La liaison de l'endothéline à son récepteur active une protéine G couplée à la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse des phospholipides membranaires, donnant ainsi naissance à l'inositol triphosphate d'une part, et au 1-2 diacyl-

glycérol d'autre part. Par des voies de transduction intracellulaires différentes, ces deux messagers intracellulaires entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium responsable de la contraction de la cellule musculaire lisse (109).

Dans les artères pulmonaires, les récepteurs ET-A sont exprimés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires alors que les récepteurs ET-B sont présents sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses vasculaires périphériques (110). L'activation des récepteurs ET-A et ET-B sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires entraîne une vasoconstriction et une prolifération des cellules musculaires lisses (110-113). L'activation des récepteurs ET-B situés sur les cellules endothéliales provoque la libération de NO et de Pgl<sub>2</sub> possédant des propriétés vasodilatatrices (114) et prévient l'apoptose des cellules endothéliales (115). Le récepteur ET-B présent à la surface des cellules endothéliales joue également un rôle dans la clairance de l'ET-1 plasmatique (116). L'administration par voie intraveineuse d'ET-1 induit au niveau de la circulation pulmonaire une réponse biphasique avec une vasodilatation modérée initiale suivie d'une vasoconstriction soutenue (117). La vasodilatation initiale correspond à la libération de NO et de Pgl<sub>2</sub> médiée par les récepteurs ET-B endothéliaux suivie d'une vasoconstriction médiée par la liaison de l'ET-1 sur les récepteurs ET-A et ET-B présents sur les cellules musculaires lisses (117). De plus, l'ET-1 par son effet pro-proliférant sur les cellules musculaires lisses participe au remodelage de microcirculation pulmonaire présent dans l'HTAP (110).

#### *1.4.3.4 Voies de la transduction intracellulaire de l'endothéline 1*

L'ET-1 entraîne une augmentation biphasique de calcium intracellulaire ([Ca]<sub>i</sub>) consistant en une première phase d'augmentation très rapide de [Ca]<sub>i</sub> (1 à 5 secondes) suivie d'une augmentation moindre mais plus soutenue (20 minutes) (104). Cette voie de transduction

rapide intervient dans les actions biologiques de contraction et de sécrétion mettant en jeu l'ET-1.

Cette augmentation de  $[Ca]_i$  est la conséquence de l'activation de la phospholipase C après fixation de l'ET-1 sur le récepteur ET-A qui hydrolyse le phosphatidyl inositol 4.5 biphosphates pour former l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) et le diacylglycerol (DAG).  $IP_3$  induit une mobilisation de calcium du réticulum sarcoplasmique permettant une augmentation du  $[Ca]_i$  qui active les canaux calciques membranaires stimulés par la vidange des stocks intracellulaires de calcium. Le DAG permet l'ouverture des canaux calciques de type ROC. La dépolarisation membranaire sous l'action de l'élévation de  $[Ca]_i$  est permise par l'inhibition de canaux potassiques voltages dépendants (VDCC) ; cette dépolarisation est aussi induite par une action directe d'ET-1 sur les canaux cationiques non sélectifs (NSCC). Enfin l'augmentation de  $[Ca]_i$  active les échanges Na/H entraînant une alcalinisation intracellulaire qui active l'échange Na/Ca participant ainsi à une élévation soutenue du  $[Ca]_i$ . De plus ET-1 entraîne un signal nucléaire qui active la transcription de gènes. Cette voie est responsable de l'action proliférative de l'ET-1. ET-1 stimule l'activité des protéines kinases C (PKC) qui est aussi favorisée par l'élévation du  $[Ca]_i$ . La PKC promeut la progression du cycle cellulaire via le complexe calcium/calmoduline et l'induction de proto-oncogènes c-fos, c-myc, et c-jun (118, 119).

L'activation du récepteur ET-B par ET-1 entraîne des effets similaires sur l'activation de la phospholipase C, la synthèse d' $IP_3$  et de DAG et l'élévation de  $[Ca]_i$ . Toutefois, l'activation de ce récepteur permet d'activer la phospholipase  $A_2$  qui entraîne une augmentation de la synthèse de prostaglandines vasodilatatrices ( $Pgl_2$  et  $PgE_2$ ) et de thromboxane  $A_2$  (120, 121).

#### 1.4.3.5 *Implication de l'endothéline dans la physiopathologie de l'HTAP*

Chez l'adulte sain les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont très faibles (de l'ordre de 1 à 2 pg/mL). Chez les sujets atteints d'HTAP, des concentrations élevées (de l'ordre de 3.5 pg/mL) ont été mises en évidence (122). Au niveau pulmonaire, Giaid et coll ont montré que l'expression de l'ET-1 et de son ARNm était augmenté dans les poumons de sujets atteints d'HTAP (123). Rubens et coll ont montré que les concentrations plasmatiques d'ET-1 étaient corrélées à plusieurs paramètres de gravité de l'HTAP (124) suggérant que le taux plasmatique d'ET-1 pourrait être un paramètre pronostique au cours de l'HTAP (124). Enfin, plusieurs essais randomisés contre placebo ont démontré que l'utilisation d'antagonistes non sélectif (bosentan) ou sélectif d'ET-A (sitaxentan, ambrisentan) chez des patients atteints d'HTAP du groupe améliore significativement les performances à l'effort (test de marche de 6 minutes) et les symptômes (scores de dyspnée) (125-127). Toutefois, l'avantage théorique de bloquer sélectivement ET-A pour laisser libre ET-B impliqué dans la clairance d'ET-1 et dans la production de NO et de Pgl<sub>2</sub>, ne se traduit pas par une efficacité clinique plus importante dans les différents essais thérapeutiques (125-127).

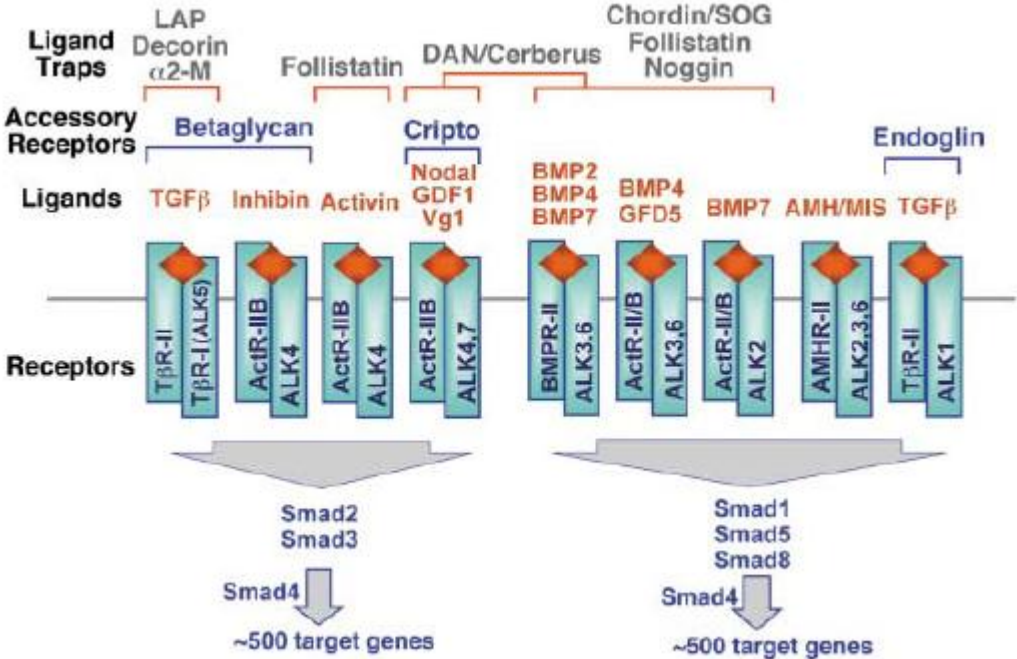
#### 1.4.4 *La superfamille du Transforming Growth Factor beta (TGFβ)*

Les protéines morphogéniques osseuses (*bone morphogenic proteins (BMP)*), les isoformes du TGFβ (TGFβ1-3), et les facteurs de croissance et différenciation (*growth differentiation factor (GDF)*) appartiennent à la superfamille du TGFβ (128). Ces protéines, initialement identifiées comme des molécules régulant la croissance et la différenciation des os et du cartilage, jouent en fait divers rôles dans une grande variété de processus physiologiques impliqués notamment dans l'homéostasie vasculaire parmi lesquels la prolifération, la migration, la différenciation, et l'apoptose (128). Physiologiquement, ces protéines

interagissent avec un récepteur de type I (*activin receptor like kinase* (ALK3)/BMPR-IA, ALK6/BMPR-IB, ALK2...) et un récepteur de type II (BMPR-II, TGFβR-II...) pour former un hétérodimère (128) (Figure 4). Des mutations germinales dans le gène codant pour un récepteur de type II, le BMPR-II, ont été identifiées chez près de 70% des cas d'HTAP familiales et 10 à 30% des cas d'HTAP idiopathiques ou associées à la prise d'anorexigènes (9, 129). Environ 144 mutations différentes ont été identifiées chez 210 patients atteints d'HTAP héritable (130). Environ 30% de ces mutations sont des mutations faux-sens survenant dans des séquences hautement conservées d'acides aminés et modifiant ainsi de façon prédictible la fonction du récepteur. Par exemple, la plupart de ces mutations affecte le domaine sérine-thréonine kinase ou le site de liaison extracellulaire du récepteur. Cependant, la majorité (environ 70%) des mutations sont des mutations non sens conduisant dans la majorité des cas à la production d'un transcript non sens. Ainsi, l'insuffisance haploïde représente le mécanisme moléculaire prédominant pour la survenue de l'HTAP héritable (130). L'absence de mutation de BMPR-II dans certaines familles et dans la plupart des cas sporadiques et associés indique qu'il pourrait y avoir d'autres gènes à identifier, possiblement liés à la voie BMP/TGFβ. Ainsi des mutations d'autres récepteurs de la superfamille du TGFβ, ALK1 (ou ACVRL1) ou endogline, ont été décrites dans des cas d'HTAP associées à une histoire personnelle ou familiale de maladie de Rendu-Osler (7, 8, 131, 132).



Figure 4: Superfamille du TGF-β : récepteurs, ligands et voies de signalisation (d'après (128))



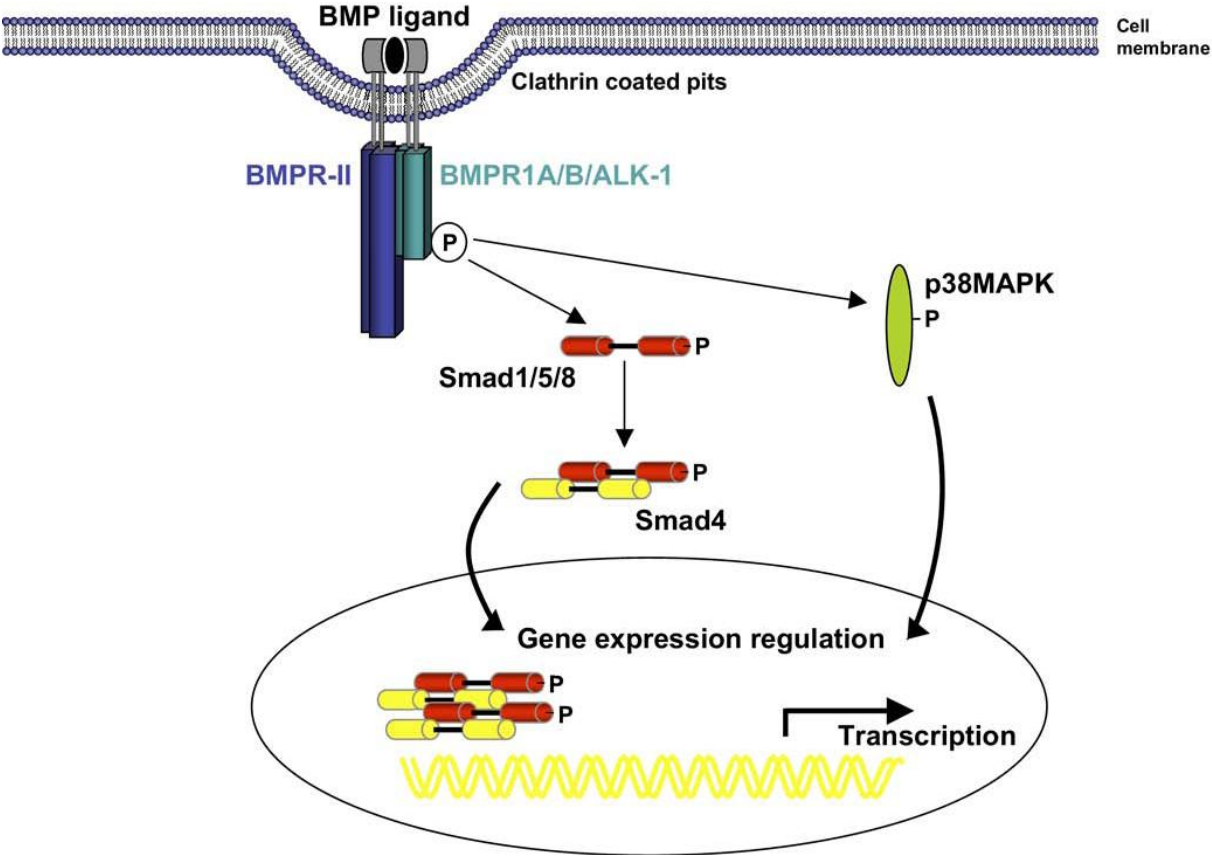
#### 1.4.4.1 Voies de signalisation physiologiques

BMPR-II est un récepteur à activité sérine-thréonine-kinase qui fixe BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP9, GDF5 et GDF6. L'interaction ligand-récepteur est facilitée par la présence du récepteur de type I (ALK3/BMPR-IA, ALK6/BMPR-IB, ALK2). Ce récepteur comprend 4 domaines fonctionnels distincts : une partie N-terminale de liaison, un domaine transmembranaire, une sérine-thréonine kinase et un domaine cytosolique.

- Transduction des signaux dépendante des Smad.

Après la fixation du ligand au récepteur BMP-RII, le récepteur de type II forme un complexe avec le récepteur de type I et entraîne la phosphorylation de ce dernier (Figure 5). Cette phosphorylation d'un domaine riche en glycine et sérine à la partie proximale du segment intracellulaire du récepteur de type I active le domaine kinase de ce récepteur, déclenchant la phosphorylation de protéines cytoplasmiques, les Smad, qui sont responsables de la transduction des signaux déclenchés par les molécules de la superfamille du TGF- $\beta$  (128). Les BMP génèrent des signaux en activant un ensemble spécifique de protéines Smad (Smad1, 5 et 8, appelés *receptor activated Smads* (R-Smad)), qui doivent former un complexe avec une molécule *common partner Smad* (co-Smad ou Smad4) pour fonctionner de façon optimale. Le complexe R-Smad et co-Smad pénètre dans le noyau, où il régule directement la transcription de différents gènes (128). La spécificité tissulaire des signaux BMP serait déterminée par de multiples niveaux de régulation, notamment la présence d'inhibiteurs endogènes des BMP (chordine, noggine et BAMBI), les interactions entre récepteurs type I/type II, l'activation des Smad inhibiteurs (I-Smad: Smad 6 et 7) et la présence de co-répresseurs et co-activateurs nucléaires.

Figure 5: voies de signalisation physiologique BMP/TGFβ (d'après (9))



Chez l'Homme, les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires et les cellules endothéliales expriment un large éventail de récepteurs de la super-famille du TGF- $\beta$ , y compris BMP-RII et BMP-RI, et fixent  $^{125}\text{I}$ -TGF- $\beta$ 1 et  $^{125}\text{I}$ -BMP-4. De plus, l'activation de ces récepteurs par les BMP conduit à la phosphorylation de Smad1 et à l'induction d'ARNm pour Smad6 et Smad7.

- Transduction des signaux indépendante des Smad.

Bien que la transduction par l'intermédiaire des Smad soit bien caractérisée, un ensemble croissant de données indique que les kinases MAP, notamment ERK, JNK, et p38MAPK, sont activées par les BMP et les TGF- $\beta$  dans certains types cellulaires (133, 134). La voie spécifique activée par BMP-RII pourrait dépendre de ce qui survient en amont: soit le ligand stimule les hétérodimères type I/type II préformés (phénomène Smad-dépendant), soit il provoque le recrutement à la membrane de récepteurs type I et type II liés au complexe de transduction (135).

#### *1.4.4.2 Conséquences des mutations de BMPRII*

Les mécanismes impliqués dans la perturbation de la voie de signalisation BMP/Smad sont complexes, hétérogènes et spécifiques à chaque type de mutation (136). La majorité des mutations siégeant sur le gène codant pour BMPRII aboutit à la production d'une protéine tronquée (130). La plupart de ces mutations est à l'origine d'une altération de la signalisation impliquant les Smad alors que la voie de signalisation impliquant les MAP kinases semble conservée (137). Ainsi, la perte d'une signalisation physiologique BMPRII/Smad pourrait exagérer la susceptibilité des cellules vasculaires à proliférer et supprimer l'apoptose. La voie de signalisation BMP/Smad peut présenter une hétérogénéité tissulaire car elle peut être régulée par des Smads inhibiteurs endogènes (chordin, noggin) et par des Smads inhibiteurs

(Smads 6 et 7), et aussi en raison d'une composition variable de l'hétérodimère qui compose le récepteur (138). Ceci pourrait expliquer la restriction de cette maladie vasculaire à la circulation pulmonaire.

- Etudes sur cellules et tissus provenant de patients souffrant d'HTAP

Dans le poumon, BMPR-II est physiologiquement exprimé au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires (139) et à un moindre niveau dans les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. L'expression vasculaire pulmonaire de BMPR-II est nettement diminuée chez les patients présentant une mutation sur le gène codant pour BMPR-II qui devrait conduire à la production d'une protéine tronquée (2 délétions partielles, mutation à trame décalée 1 exon 3 – 355delA) (139). Cette expression est également diminuée chez les patients souffrant d'HTAP idiopathique et ne présentant pas de mutation du gène codant pour BMPR-II. Une réduction peu marquée mais significative a aussi été observée dans plusieurs cas d'hypertension pulmonaire secondaire. La diminution de l'expression de BMP-RII était spécifique de ce récepteur puisqu'il n'y avait aucune différence entre les groupes dans le niveau d'expression du marqueur endothélial CD31 ou du récepteur TGF- $\beta$  type II (TGF- $\beta$ RII). Étant donné que la sévérité hémodynamique de l'hypertension pulmonaire était similaire dans les formes idiopathiques et secondaires, et qu'une vasculopathie plexiforme sévère était présente dans les deux groupes, l'effondrement de l'expression de la protéine BMP-RII dans l'HTAP idiopathique n'est probablement pas simplement une conséquence de l'élévation de la pression artérielle pulmonaire. Ces observations incitent plutôt à penser qu'une réduction marquée de l'expression de BMP-RII est une caractéristique spécifique de l'HTAP, mais que des diminutions moins marquées pourraient contribuer à d'autres formes d'hypertension pulmonaire. Ainsi, une diminution de l'expression de BMPR-II semble être importante dans la physiopathologie de l'HTAP. De plus, puisque le niveau d'expression de

BMPR-II est considérablement diminuée dans les familles de patients atteints d'HTAP héritable, ceci suggère que d'autres facteurs environnementaux ou génétiques sont nécessaires pour réduire encore l'expression de BMPR-II en deçà d'un niveau qui induit le remodelage vasculaire pulmonaire. La phosphorylation des Smad 1/5 est également réduite au sein de la paroi artérielle pulmonaire chez les patients souffrant d'HTAP avec ou sans mutation du gène codant pour BMPR-II (140). La réponse des cellules musculaires lisses à une stimulation par les BMP dépend en partie de la localisation anatomique des cellules. Lorsque les CML sont isolées à partir d'artères pulmonaires proximales (principale ou lobaire), la prolifération de ces cellules induite par le sérum de veau foetal tend à être inhibée par le TGF- $\beta$ 1 et les BMP2, 4 et 7 (140). Les BMP pourraient induire l'apoptose de ces cellules (137) et cet effet antiproliférant des BMP est Smad1 dépendant (140). En revanche, lorsque les CML sont isolées à partir d'artères pulmonaires distales (1 à 2 mm de diamètre), les BMP2 et 4 stimulent leur prolifération (140). Cet effet pro-proliférant est dépendant de l'activation des voies ERK1/2 et p38MAPK. Les voies Smad et p38MAPK sont activées de la même façon dans les CML proximales ou distales mais l'intégration des ces signaux par les cellules diffère selon leur localisation. Cette intégration pourrait se faire d'une importante famille de facteurs de transcription : les inhibiteurs de liaison à l'ADN (Id genes) (141).

Les cellules endothéliales isolées à partir d'artères pulmonaires prolifèrent, migrent et forment des structures tubulaires en réponse à BMP4 et 6 (142). De plus, les BMP ont un effet anti-apoptotique (143). BMP9, qui agit en se liant à BMPR-II et ALK1, semble inhiber la prolifération des cellules endothéliales. Les effets contraires des BMP sur les cellules endothéliales et musculaires lisses artérielles pulmonaires fournit une hypothèse pour la genèse des lésions vasculaires pulmonaires et son remodelage dans l'HTAP héritable (144).

Une importante réduction de la fonction de BMPR-II au niveau endothélial pourrait favoriser l'apoptose des cellules endothéliales et endommager la barrière endothéliale. Ceci pourrait permettre l'action de facteurs sériques et stimuler l'activation d'élastases vasculaires. Ces hauts niveaux d'apoptose au niveau endothélial pourraient favoriser l'apparition de clones de cellules endothéliales résistants à l'apoptose conduisant à la formation des lésions plexiformes. Au niveau de la media, les cellules musculaires lisses sont également affectées dans leurs capacités à répondre aux effets anti-proliférants des BMP et sont exposées à des facteurs de croissance stimulant leur prolifération à l'origine de l'hypertrophie de la media (144).

- Etudes sur les modèles animaux d'HTAP

Une réduction de l'ARNm et de la protéine BMPR-II a été mise en évidence dans les poumons de modèles animaux d'HTAP (145, 146). L'activation de microARN, régulant l'expression de gène en inhibant la translation, serait un de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle impliqué dans la diminution de l'expression de la protéine BMPR-II au cours de l'HTAP (147). Des souris présentant une délétion conditionnelle de BMPR-II au niveau de l'endothélium pulmonaire sont susceptibles de développer une HTAP bien qu'elle ne se développe que dans un sous-groupe (148). Des souris surexprimant, au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires, un dominant négatif BMPR-II développent une forme vasospastique d'HTAP sans remodelage microvasculaire pulmonaire mais associée à une diminution de l'expression des canaux potassiques Kv1.5 (149). Cette hypertension pulmonaire est réversible sous vasodilatateur (nifédipine). Dans un modèle d'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat, l'administration par voie inhalée de BMPR-II via un adénovirus ne prévient pas la survenue d'une HTAP (67). En revanche, la délivrance ciblée à l'aide d'un vecteur de BMPR-II au niveau de l'endothélium pulmonaire réduit

significativement l'hypertension pulmonaire dans un modèle de rats hypoxiques (150). Le rôle crucial de la voie des BMP dans le développement vasculaire a été clairement démontré dans des études de délétion génique chez la souris. L'homozygotie pour une mutation nulle dans le gène BMPR-II est létale pendant la phase précoce de l'embryogenèse (151), et les souris déficientes en Smad5, l'un des Smad qui agit en réponse aux BMP, meurent en raison d'anomalies de l'angiogenèse liées à une absence de recrutement du muscle lisse vasculaire aux structures endothéliales. Cependant, les souris hétérozygotes BMPR-II +/- survivent jusqu'à l'âge adulte sans phénotype particulier (152). Toutefois, lorsque ces animaux sont exposés soit à une surexpression pulmonaire d'interleukine-1 $\beta$  (153), soit à une perfusion chronique de sérotonine (152), ils développent une hypertension pulmonaire plus importante que les animaux contrôles. Ces données suggèrent donc qu'une dysfonction de BMPR-II augmente la susceptibilité de développer une hypertension pulmonaire en présence d'un autre facteur stimulant environnemental. Plusieurs lignées de souris transgéniques surexprimant une forme mutée du gène BMPRII ont actuellement été développées. Certaines de ces souris exprimant le gène muté de façon conditionnelle semblent développer spontanément une hypertension artérielle pulmonaire. Ces animaux devraient dans l'avenir constituer un modèle unique permettant d'explorer les mécanismes par lesquels une dysfonction de la voie BMPRII conduit au développement de l'hypertension artérielle pulmonaire.

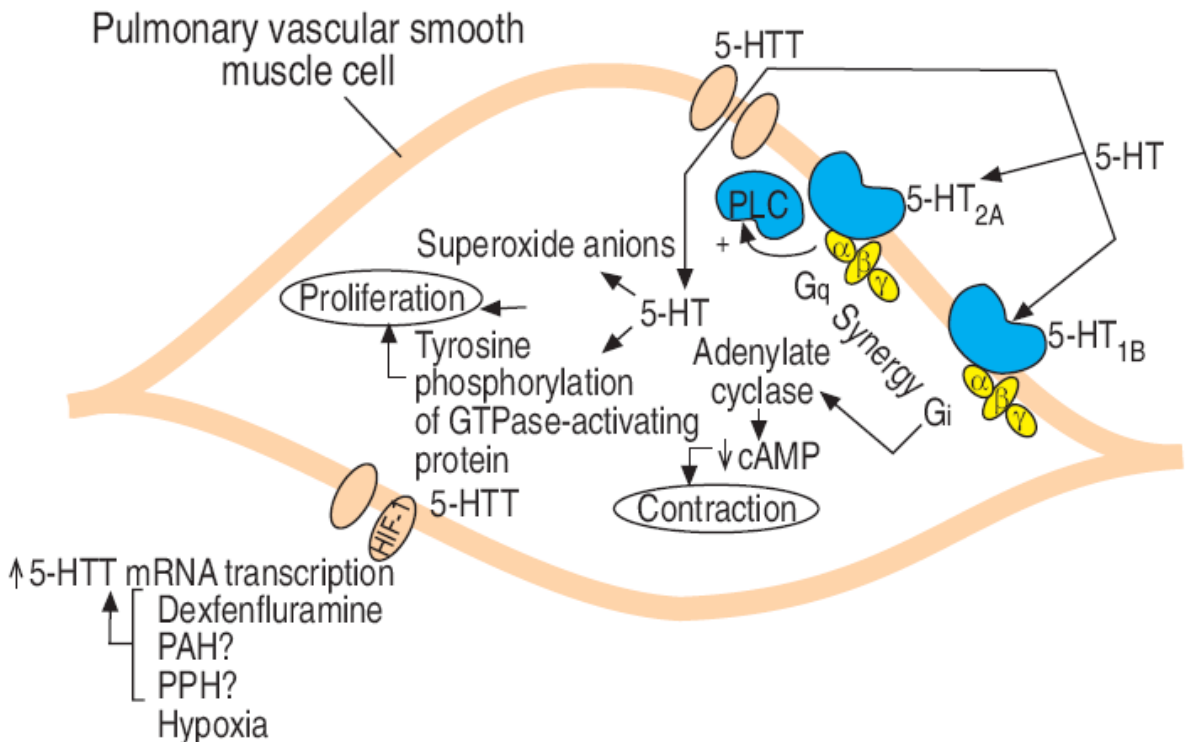
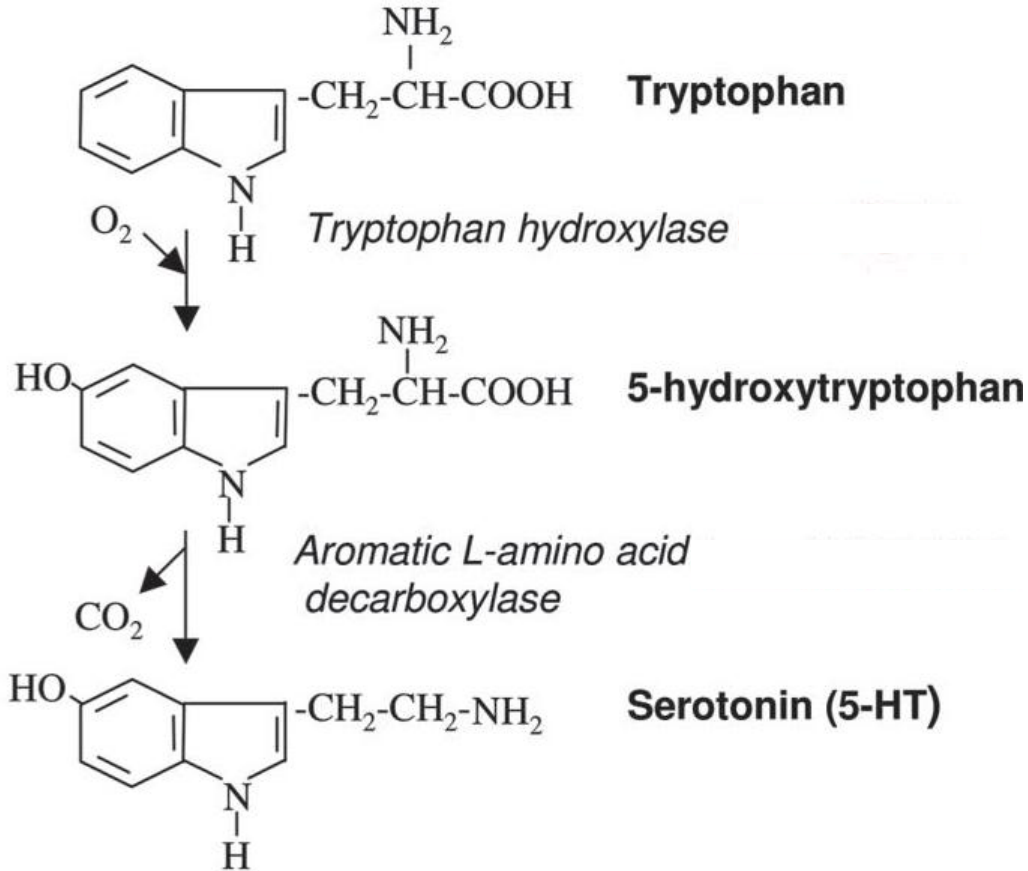
#### 1.4.5 La sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est une amine endogène vasoactive principalement synthétisée par les cellules entérochromaffines de l'intestin puis libérée dans la circulation portale où elle est en partie dégradée par le foie (Gershon et al 1999). La



sérotonine gagne ensuite la circulation systémique où elle est captée et stockée principalement dans les granules denses des plaquettes par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire spécifique, le transporteur de la sérotonine (5-HTT). Ainsi, 98% de la sérotonine circulante est contenue dans les plaquettes, le reste est dégradé lors de son passage dans le poumon. La concentration de sérotonine libre est donc infime. La L-tryptophane est l'acide aminé précurseur de la sérotonine. Elle subit d'abord une hydroxylation au niveau de son cycle benzène par la tryptophane hydroxylase (tph) pour former la 5-hydroxytryptophane qui subit enfin une décarboxylation par une aromatic L-amino acid decarboxylase pour former la sérotonine (Figure 6). L'activité de la tph est un marqueur de la synthèse de la sérotonine. Il existe 2 isoformes de la tph, tph1 et tph2, codés par 2 gènes distincts. La tph1 est principalement exprimée au niveau de l'intestin et de la glande pinéale (154). La tph2 semble exclusivement exprimée dans les neurones (155). Ainsi, la synthèse de la sérotonine est principalement contrôlée par la tph2 dans le système nerveux central et par la tph1 dans les organes périphériques (154-156).

**Figure 6:** synthèse de la sérotonine



Bien que la sérotonine soit principalement synthétisée par les cellules entérochromaffines de l'intestin, de faibles taux de sérotonine peuvent être formés dans d'autres organes. Ainsi, les cellules endothéliales pulmonaires humaines peuvent produire de la sérotonine et expriment la tph1. De plus, comparativement à des cellules normales, les cellules endothéliales cultivées à partir de poumons de patients transplantés pour une HTAP expriment plus la tph1 et synthétisent plus de sérotonine (157).

De nombreux arguments cliniques plaident en faveur de l'implication de la sérotonine dans la physiopathologie de l'HTAP. Ainsi, des concentrations plasmatiques élevées de 5-HT ont été mesurées chez de nombreux patients atteints d'HTAP sans normalisation après transplantation cardio-pulmonaire indiquant que cette augmentation n'était pas la simple conséquence de l'élévation des pressions pulmonaires (158). Dans les années 60, une augmentation dramatique du nombre de cas d'HTAP est survenue après la commercialisation de l'aminorex, un anorexigène qui augmente la concentration de sérotonine libre en interagissant avec le 5-HTT (13). Quelques années plus tard, deux larges études épidémiologiques ont démontré une association entre l'exposition aux dérivés de la fenfluramine, un autre anorexigène interagissant avec le 5-HTT, et la survenue de l'HTAP (14, 15).

En plus de ses effets vasoactifs, la sérotonine exerce des effets mitogènes et co-mitogènes sur les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et favorise les microthromboses locales (159). L'action vasoconstrictrice de la sérotonine s'exerce principalement par l'activation des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> et 5-HT<sub>2A</sub> (160). En revanche, l'activité mitogénique de la sérotonine nécessite son internalisation par le transporteur membranaire 5-HTT. En effet, les effets mitogènes de la sérotonine sur les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires sont bloqués par les inhibiteurs sélectifs du 5-HTT tels la fluoxétine ou

le citalopram mais pas par des antagonistes des récepteurs de la sérotonine tels la kétansérine (antagoniste du 5-HT<sub>2A</sub>) (161, 162). Par ailleurs, le rôle du 5-HTT en tant que médiateur de l'activité mitogénique de la sérotonine semble spécifique des cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire puisqu'il n'est pas impliqué dans cette fonction dans les cellules musculaires lisses vasculaires systémiques dans lequel il est d'ailleurs peu exprimé (159). Le 5-HTT est codé par un gène unique exprimé dans divers types cellulaires comme les neurones, les plaquettes et les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux pulmonaires. Chez l'homme, le niveau d'expression du 5-HTT semble considérablement plus élevé dans le poumon que dans l'encéphale. Ainsi, toute altération de l'expression du 5-HTT retentit directement sur l'activité proliférative des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires. Les anorexigènes fenfluramine, d-fenfluramine et aminorex diffèrent des inhibiteurs sélectifs du 5-HTT dans la mesure où ceux-ci interagissent de façon complexe avec le 5-HTT et certains récepteurs de la sérotonine (5-HT<sub>2B</sub>) mais également la libération de sérotonine à partir des plaquettes (163, 164).

Plusieurs travaux ont démontré un lien étroit entre le niveau d'expression et/ou d'activité pulmonaire du 5-HTT et le développement de l'HTAP expérimentale. Les souris déficientes en 5-HTT sont protégées contre le développement de l'HTAP hypoxique (165). L'hypoxie augmente l'expression et l'activité du 5-HTT dans les cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire selon un mécanisme faisant intervenir une activation transcriptionnelle (161). La conséquence est que l'activité mitogénique de la sérotonine est potentialisée par la pré-exposition des cellules musculaires lisses à l'hypoxie. Cette surexpression du 5-HTT induite *in vitro* par l'hypoxie est retrouvée *in vivo* chez les souris exposées à l'hypoxie au niveau de la media des artères pulmonaires distales et proximales (161). L'administration chronique d'inhibiteurs sélectifs du 5-HTT atténue l'HTAP hypoxique et induite par la monocrotaline

(165, 166). Les antagonistes des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1B</sub> à la sérotonine sont sans effets (165). Afin d'évaluer si la surexpression du 5-HTT dans les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires est suffisante pour le développement d'une HTAP, Guignabert et coll ont développé une lignée de souris transgéniques surexprimant sélectivement le 5-HTT dans les cellules musculaires lisses sous le contrôle du promoteur SM22 (71). Ces souris SM22-5-HTT<sup>+</sup> développent une HTAP sans aucune altération de la biodisponibilité de sérotonine (71). Chez ces souris qui développent spontanément un remaniement hypertrophique de la paroi vasculaire, le niveau d'expression du 5-HTT est 3 à 4 fois celui d'animaux témoins, ce qui correspond au niveau d'expression fréquemment retrouvé dans l'HTAP humaine. Une association entre HTAP hypoxique et surexpression du 5-HTT avait été antérieurement démontrée chez des souris transgéniques surexprimant le 5-HTT sous le contrôle du promoteur humain (167). L'ensemble de ces données démontre donc l'existence d'un lien étroit entre le niveau d'expression et/ou d'activité du 5-HTT pulmonaire et le développement d'une HTAP expérimentale.

Chez l'Homme, plusieurs études ont également permis d'identifier le rôle du 5-HTT dans la physiopathologie de l'HTAP humaine. Le 5-HTT est exprimé en grande quantité dans le poumon, où il est présent principalement sur les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires et peu sur les cellules endothéliales (161, 162). Au cours de l'HTAP idiopathique, des études immunohistochimiques ont montré une surexpression du 5-HTT dans la media des artérioles remodelées et dans les lésions en bulbe d'oignon (168). De façon intéressante, cette surexpression protéique et de l'activité du 5-HTT persiste dans des cultures de cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires provenant de patients avec une HTAP idiopathique (168). De plus, ces cellules se caractérisent par une activité proliférative anormalement élevée en réponse à des doses croissantes de sérotonine ou au

sérum alors que leur réponse proliférative à d'autres facteurs de croissance tels le PDGF, le FGF, le TGF $\beta$ , l'EGF ou l'IGF ne diffère pas de celle de sujets témoins (168). Cette croissance anormale est inhibée en présence d'inhibiteurs sélectifs du 5-HTT comme la fluoxétine ou le citalopram (168). Il en résulte donc que la surexpression du 5-HTT est responsable de l'augmentation de l'activité mitogène de la sérotonine et du sérum (qui contient des concentrations micromolaires de sérotonine) au cours de l'HTAP idiopathique (168).

Le fait que la surexpression du 5-HTT persiste dans des cellules étudiées *in vitro* et donc extraites de leur environnement pathologique apparaît donc comme une anomalie intrinsèque des cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire intimement liée au phénotype pathologique de l'HTAP idiopathique. Il a été démontré que l'expression du 5-HTT est soumise à une régulation génétique liée à un polymorphisme de la région promotrice du gène 5-HTT humain (169). Ce polymorphisme consiste en deux allèles fréquents, une insertion ou une délétion de 44 bp, appelés allèles long ou L et court ou S (Short) respectivement. L'allèle L induit la transcription du gène 5-HTT deux à trois fois plus vite qu'avec l'allèle S. Ainsi, l'expression du 5-HTT varie en fonction du génotype S/S, L/S ou L/L dans les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires de sujets témoins et détermine la réponse proliférative de ces cellules à la sérotonine ou au sérum (168). Les cellules du génotype L/L expriment davantage le 5-HTT et prolifèrent plus en réponse à la sérotonine (168). Néanmoins, ce polymorphisme ne peut expliquer l'augmentation de l'expression pulmonaire ou cellulaire du 5-HTT au cours de l'HTAP. En effet, les niveaux d'ARNm ou d'activité du 5-HTT dans les cellules L/L de sujets témoins restent toujours inférieurs au niveau mesuré dans les cellules de patients porteurs d'une HTAP et ce quel que soit leur génotype (170). D'autres facteurs, notamment environnementaux, peuvent également participer à la surexpression du 5-HTT au cours de l'HTAP parmi lesquels,

l'hypoxie, l'inflammation ou une dysfonction de BMPR2. Dans une population de 89 patients souffrant d'HTAP idiopathique, 65% des patients avaient un génotype L/L alors que la fréquence de ce génotype était de 27% dans la population témoin. Cette forte prévalence du génotype L/L au cours de l'HTAP n'a cependant pas été retrouvée dans d'autres études ayant inclus un plus grand nombre de patients (171, 172). Ces résultats discordants pourraient être dus à la forte proportion de patients transplantés dans l'étude d'Eddahibi et coll (168). Ainsi, le génotype homozygote L/L ne représente pas un facteur de susceptibilité ou de prédisposition à l'HTAP mais pourrait intervenir comme gène modificateur et influencer la sévérité ou l'évolutivité de la maladie. Bien que l'allèle long du promoteur du gène 5-HTT soit fortement lié à l'HTAP idiopathique, ce fait n'explique pas entièrement l'augmentation de l'expression de 5-HTT chez les malades qui ont une HTAP. Ainsi, la présence concomitante d'autres facteurs est probablement nécessaire à l'apparition d'une surexpression de 5-HTT. Il reste à déterminer si cette surexpression est due à une altération du gène 5-HTT lui-même ou à des altérations d'autres facteurs mis en jeu dans la régulation de l'expression du gène 5-HTT. L'étude des voies moléculaires qui lient le génotype BMP-RII mutant, l'expression de 5-HTT, et le phénotype HTAP idiopathique est donc nécessaire.

Afin d'évaluer si la sérotonine était impliquée dans le « dialogue » entre les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires pulmonaires dans l'HTAP, du milieu de culture sans sérum provenant de cellules endothéliales isolées à partir de prélèvements pulmonaires de patients avec une HTAP idiopathique a été utilisé pour cultiver des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires provenant du même individu. L'adjonction de fluoxetine, qui bloque l'action mitogénique de la sérotonine sur les cellules musculaires lisses en inhibant le 5-HTT, diminuait la réponse proliférative du milieu de culture des cellules endothéliales de près de 50% alors que l'adjonction d'antagonistes des récepteurs de l'endothéline n'avait

aucun effet (157). Ces résultats indiquent que la sérotonine représente le principal facteur de croissance relargué par les cellules endothéliales pulmonaires et qui agit sur les cellules musculaires lisses. Sullivan et coll avaient démontré que la sérotonine était le principal facteur de croissance relargué par les cellules endothéliales après stimulation par l'angiopoiétine 1. L'adjonction de PCPA, un inhibiteur sélectif de la tph 1, dans le milieu de culture de cellules endothéliales rend indétectable le taux de sérotonine et de 5-HTT et réduit la réponse proliférative des cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires dans des proportions comparables à ce qui était observé avec la fluoxétine (157). Enfin, la combinaison des 2 drogues (PCPA et fluoxétine) ne produisait aucun effet prolifératif sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (157). Ainsi, lorsqu'une déplétion de la sérotonine intracellulaire est obtenue par l'inhibition de la synthèse de la sérotonine (avec le PCPA) dans les cellules endothéliales, le blocage du 5-HTT par la fluoxétine n'a pas d'action antiproliférative complémentaire (157). Enfin, la tph 1 est fortement exprimée en immunohistochimie au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire normal (157). Ces données démontrent donc que la sérotonine est synthétisée par les cellules endothéliales dans le poumon normal et représente le principal facteur de croissance produit par les cellules endothéliales qui agit sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires selon un mode paracrine. Ces données semblent spécifiques à la circulation pulmonaire puisque la sérotonine ne possède pas cette action mitogénique sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux systémiques (159).



#### 1.4.6 Chimioquinas et mécanismes inflammatoires

Des mécanismes inflammatoires semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'HTAP (173). Cette hypothèse inflammatoire est soutenue par diverses constatations cliniques et des résultats expérimentaux.

##### *1.4.6.1 Constatations cliniques*

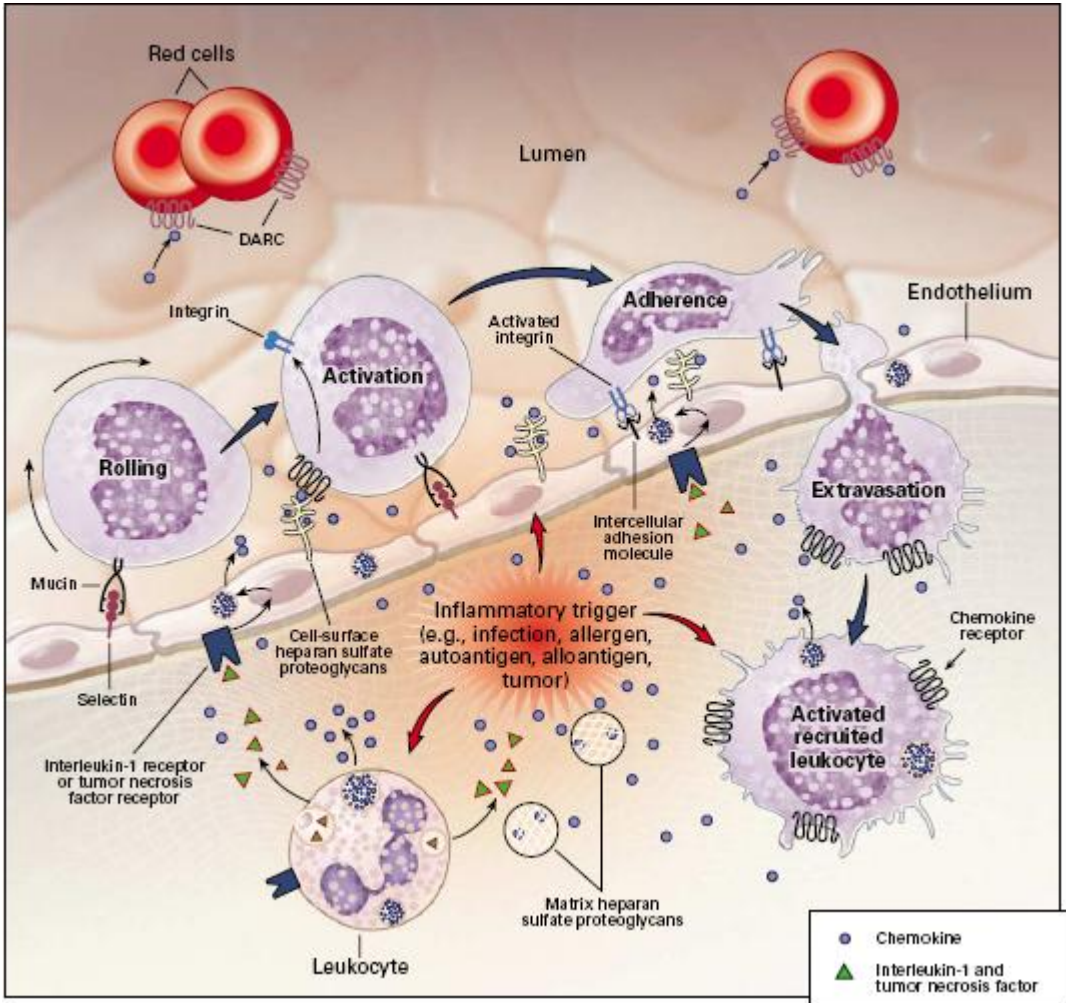
Une HTAP sévère peut compliquer l'évolution de nombreuses pathologies inflammatoires telles les connectivites (18, 174), certaines vascularites (175), ou affectant le système immunitaire telles le POEMS (Polyneuropathy Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal immunoglobulin, Skin changes) syndrome (176), le syndrome de Castleman (177) ou l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (37). Une amélioration hémodynamique et clinique parfois spectaculaire a pu être observée après un traitement immunosuppresseur au cours de ces différentes affections soulignant ainsi l'importance de la composante inflammatoire chez ces patients (20, 21, 174, 176, 177). L'auto-immunité et l'inflammation contribuent également à la physiopathologie de l'HTAP idiopathique. Ainsi, des taux circulants élevés de cytokines pro-inflammatoires (interleukine (IL) 1 et IL-6), d'auto-anticorps (facteurs anti-nucléaires, anti-cellules endothéliales et anti-fibroblastes) ont été mis en évidence au cours de l'HTAP idiopathique (178, 179, 180-182). Au niveau anatomo-pathologique, il existe de nombreuses similitudes entre les lésions vasculaires pulmonaires observées au cours des connectivites et celles de l'HTAP idiopathique (183). De plus, des infiltrats de cellules inflammatoires mononucléées correspondant à des macrophages, des lymphocytes T et B et des cellules dendritiques sont fréquemment mis en évidence autour des lésions vasculaires pulmonaires de patients présentant une HTAP idiopathique (184, 185), ou associée à une connectivite (56, 183). De façon intéressante, ces

infiltrats de cellules inflammatoires n'étaient pas présents au niveau des vaisseaux non remodelés ou de l'interstitium pulmonaire (56). Enfin, ces infiltrats sont associés à une expression locale accrue de plusieurs chimiokines dont CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CX3CL1 (fractalkine).


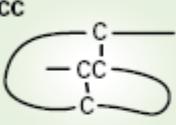




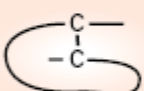




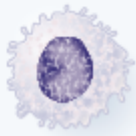
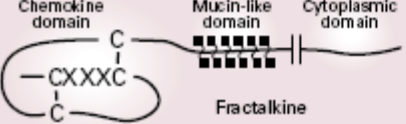
#### *1.4.6.2 Résultats expérimentaux*

Le rôle du recrutement de ces cellules inflammatoires, et notamment du lymphocyte T, et des mécanismes impliqués a fait l'objet de plusieurs études. Le recrutement des cellules inflammatoires circulant dans le flux sanguin intravasculaire vers le tissu atteint est une phase critique qui nécessite l'attachement des leucocytes à l'endothélium puis leur transmigration vers l'espace extra-vasculaire en réponse à un gradient chémo-attractant impliquant les chimiokines (Figure 7). Ce processus complexe comporte plusieurs étapes d'interactions coordonnées entre leucocyte et cellule endothéliale. Dans une première phase de capture et de roulement, le leucocyte est ralenti par les sélectines et glisse lentement le long de l'endothélium vasculaire. C'est alors que les chimiokines produites par les cellules endothéliales ou les ayant traversées par transcytose agissent sur les leucocytes exprimant les récepteurs correspondants. Il en résulte une activation des intégrines au niveau de la membrane leucocytaire qui vont trouver leurs ligands à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction permet un arrêt ferme des leucocytes. Ces phénomènes sont suivis de la diapédèse qui correspond au franchissement de la barrière endothéliale par le leucocyte puis par la migration intra-tissulaire au cours de laquelle la cellule se déplace vers la source de chimiokine (186).

**Figure 7:** recrutement des leucocytes au sein des lésions inflammatoires (d'après AD Luster et coll N Engl J Med 1998).



**Figure 8:** classification des chimiokines (d'après (187))

	Chemokine	Receptor	Cell Type		
		 Chemokine receptor			
<b>CC</b> 	MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinophil 		
	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 		
	MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 		
	Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1			
	SDF-1	CXCR4			
	MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\beta$ (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 		
	Fractalkine	CX <sub>3</sub> CR1			
	IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3			
	<b>C</b> 	PARC, DC-CK1	?	Resting T cell 	
		Lymphotactin	?		
SDF-1		CXCR4			
<b>CXC</b>  Glutamic acid-leucine-arginine	MCP-3, -4; MIP-1 $\alpha$ ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES MIP-3 $\alpha$ (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 		
	SDF-1	CXCR4			
	Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ; ENA-78; NAP-2; LXN	CXCR1 CXCR2		Neutrophil 	
	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES	CCR2 CCR5		Natural killer cell 	
	<b>CXXXC</b> 	Fractalkine			CX <sub>3</sub> CR1
		IP-10, MIG, I-TAC			CXCR3

#### 1.4.6.3 Les chimiokines

Les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire (8 à 40 kDa, à l'exception de CX3CL1 (fractalkine) : 95 kDa) qui possèdent une activité chimiotactique puissante. Au cours de l'inflammation, de nombreuses cellules telles les cellules souches tissulaires, les leucocytes résidents et recrutés, les macrophages et les cellules endothéliales activées participent à la transmission des signaux inflammatoires par le biais de l'expression de chimiokines (187). Les chimiokines sont classées en 4 sous-familles structurales définies par la position des 2 premières cystéines sur leur extrémité NH<sub>2</sub> terminale (Figure 8): lorsqu'elles sont séparées par un acide aminé, on les appelle les CXC chimiokines ; lorsqu'elles ne le sont pas, on les appelle les CC chimiokines ; enfin lorsqu'elles sont séparées par 3 acides aminés, on les appelle les CX<sub>3</sub>C chimiokines (187). Ces résidus déterminent, avec d'autres spécificités structurelles comme les acides aminés N-terminaux précédant les cystéines, l'affinité envers un type de cellule inflammatoire. Ainsi, les CXC chimiokines présentant une séquence acide glutamique-leucine-arginine proche du N-terminal ont des propriétés chimiotactiques envers les polynucléaires neutrophiles ; celles dépourvues d'une telle séquence attirent les lymphocytes. A l'opposé, les CC chimiokines en général n'agissent pas sur les neutrophiles mais attirent les monocytes, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes avec une spécificité variable (187). Les chimiokines sont impliquées dans la physiopathologie de diverses maladies inflammatoires. L'accumulation et l'activation des leucocytes au cours de ces pathologies sont en grande partie dues à leur rôle de médiateur. Le type d'infiltrat inflammatoire caractérisant une maladie donnée dépend en partie du sous-groupe de chimiokine exprimé dans le tissu atteint (187). Ainsi dans les maladies atopiques comme l'asthme ou la rhinite allergique, les cellules caractéristiques infiltrant la

muqueuse sont principalement des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes. Les chimiokines comme CCL11 (eotaxine) et CCL2 (MCP-1) agissent non seulement comme attracteurs pour les éosinophiles mais favorisent également la libération de médiateurs comme l'histamine et les leucotriènes. De plus, il a été démontré que les récepteurs des chimiokines peuvent se comporter comme des co-récepteurs pour des agents infectieux comme le VIH (CCR5) en facilitant l'infection des lymphocytes. L'expression de certains récepteurs peut être limitée à certains types leucocytaires alors que d'autres récepteurs sont retrouvés à la surface de plusieurs types cellulaires parfois très différents. Une fois liée à la cellule cible, les chimiokines influencent la cytokinèse par activation et amplification de la motilité cellulaire. Elles possèdent également la propriété d'induire la migration cellulaire en direction de leur propre gradient de concentration, c'est le chimiotactisme (187). Par ce mécanisme, le tissu présentant une réaction inflammatoire et exprimant des chimiokines va attirer des cellules inflammatoires de différents types.

L'implication des chimiokines dans le recrutement des cellules inflammatoires au cours de l'HTAP a été récemment étudiée. Fractalkine (CX3CL1) est une chimiokine particulière qui existe sous une forme membranaire ancrée à la surface des cellules endothéliales (molécule d'adhésion cellulaire) et sous une forme soluble clivée par une protéase (protéine chimiotactique) (188, 189). Les effets de fractalkine (CX3CL1) sont médiés par un seul récepteur (CX3CR1) exprimé à la surface des monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes natural killer et les lymphocytes T activés (190, 191). CX3CL1 exerce de puissants effets chimiotactiques sur les leucocytes exprimant CX3CR1. Contrairement aux autres chimiokines, elle permet, sous sa forme membranaire, un attachement ferme et une activation des leucocytes exprimant CX3CR1 (191). Des polymorphismes du gène codant pour CX3CR1 sont associés à une diminution du risque de syndrome coronarien aigu,

suggérant que fractalkine pourrait jouer un rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires (lymphocytes T et monocytes) dans la paroi vasculaire (192). Balabanian et coll ont étudié l'implication de fractalkine dans la physiopathologie de l'HTAP humaine (193). Ils ont notamment démontré que (i) CX3CR1 était surexprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ et CD8+ provenant de patients souffrant d'HTAP idiopathique comparativement à ceux de sujets contrôles ; (ii) cette surexpression était en partie liée à une augmentation de la sensibilité de ces cellules à la fractalkine (CX3CL1) soluble ; (iii) cette réponse anormale des lymphocytes à CX3CL1 n'était pas la simple conséquence de l'hypertension pulmonaire car elle n'était pas mise en évidence chez des patients souffrant d'hypertension pulmonaire post-embolique ; (iv) le taux circulant de CX3CL1 était significativement plus élevé chez les patients souffrant d'HTAP idiopathique comparativement à des sujets contrôles ou des patients avec une hypertension pulmonaire post-embolique ; (v) l'ARNm de CX3CL1 était surexprimé dans le tissu pulmonaire de patients avec une HTAP idiopathique comparativement aux sujets contrôles ; et enfin que (vi) l'ARNm et la protéine CX3CL1 étaient exprimés au niveau des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires (193). Plus récemment, Perros et coll ont étudié l'expression en RTPCR et immunohistochimie de CX3CL1 et CX3CR1, au sein des lésions microvasculaires pulmonaires micro-disséquées, dans un modèle d'HTAP induite par la monocrotaline chez le rat (194). Ils ont montré que CX3CL1 était exprimée par les cellules inflammatoires localisées autour des vaisseaux pulmonaires remodelés et que les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires surexprimaient CX3CR1 (194). De plus, ils ont montré que des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires de rats en culture exprimaient CX3CR1 et que CX3CL1 induisait la prolifération de ces cellules mais pas leur migration (194). Ainsi, fractalkine (CX3CL1) pourrait agir comme un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires au cours

de l'HTAP (194). RANTES (Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted : CCL5) possède une activité chimiotactique puissante, médiée par au moins trois récepteurs (CCR1, CCR2, CCR3), pour les monocytes, les lymphocytes T, les éosinophiles, les basophiles et les cellules natural killer (187, 195). CCL5 jouerait un rôle clé dans la physiopathologie de plusieurs pathologies vasculaires inflammatoires telles le syndrome de Kawasaki (196), l'artérite de Takayasu (197) et les glomérulonéphrites (198). CCL5 pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'HTAP en induisant l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 impliquée dans la synthèse de l'endothéline-1. Ainsi Dorfmueller et coll ont étudié le rôle et l'implication de CCL5 dans la physiopathologie de l'HTAP humaine. Ils ont notamment montré que : (i) l'ARNm de CCL5 peut être détecté en RT-PCR dans les poumons des patients transplantés pour une HTAP et de sujets contrôles sains, (ii) un nombre significativement plus élevé de copies de CCL5 comparativement à celui de la  $\beta$ -actine dans les poumons de patients avec une HTAP, (iii) les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires sont la source principale de CCL5 en hybridation in situ et en immunohistochimie (199)

Enfin récemment, il a été prouvé que les lymphocytes ont un rôle protecteur contre le remodelage vasculaire et contribuent au maintien de l'homéostasie vasculaire pulmonaire en situation de stress (200). Les auteurs de cette étude ont utilisé un modèle animal d'HTAP induite par le blocage du récepteur au VEGF par le SU5416. Cette drogue cause une apoptose des cellules endothéliales et en association avec une exposition à l'hypoxie chronique, elle induit le développement d'une HTAP associée à une prolifération endothéliale (201) Dans cette étude, des rats athymiques soumis au SU5416 développent une HTAP en normoxie alors que des rats euthymiques n'en développent pas (200). De plus lorsque ces rats sont soumis à l'hypoxie, l'HTAP et la mortalité sont plus élevées chez les rats athymiques par rapport aux rats euthymiques (200). Enfin, l'injection de splénocytes,



contenant des lymphocytes T, B et d'autres cellules mononucléées, protège contre le développement de l'HTAP chez les rats athymiques (200). Des résultats similaires ont été rapportés chez des rats athymiques exposés à la monocrotaline (202).

#### 1.4.6.4 Facteurs de croissance

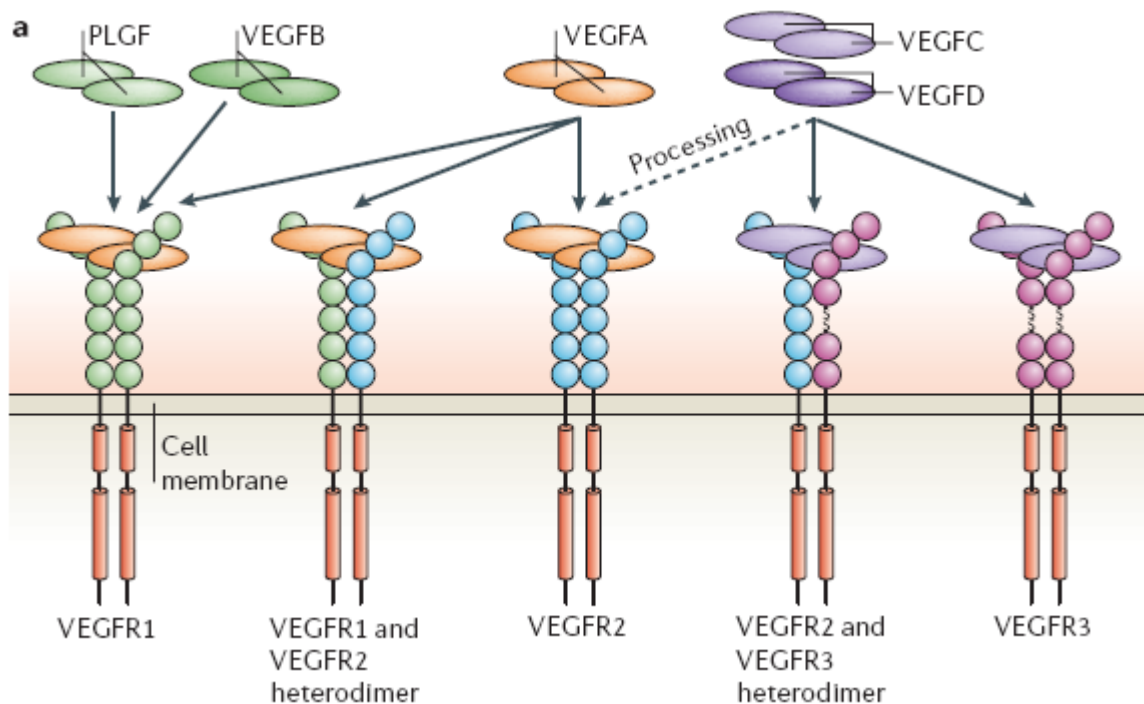
Un intérêt particulier s'est dégagé, ces dernières années, pour les facteurs de croissances tels le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), l'*epidermal growth factor* (EGF) et le *platelet-derived growth factor* (PDGF). Ces molécules sont impliquées dans le remodelage vasculaire pulmonaire et représentent des cibles thérapeutiques prometteuses en cours d'exploration.

##### 1.4.6.4.1 Le VEGF

Le VEGF est une famille de facteurs de croissance cruciaux impliqués dans la régulation du développement vasculaire pendant l'embryogenèse (vasculogenèse) et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à l'âge adulte (angiogenèse) (203). Cette famille regroupe cinq membres, VEGF-A, B, C, D et le *placenta growth factor* (PLGF) (203). Le VEGF est capable d'induire la prolifération des cellules endothéliales vasculaires par le biais de deux récepteurs tyrosine-kinase à haute affinité (VEGFR-1 et -2) (Figure 9) (203). Bien que le rôle physiologique du VEGF, qui est abondamment exprimé dans le poumon, soit inconnu, il a été proposé que ce facteur de croissance soit impliqué dans la survie cellulaire. Dans l'HTAP, l'expression du VEGF est accrue dans les vaisseaux pulmonaires y compris au sein des lésions plexiformes (61, 204). Bien que l'isoforme VEGF-A ait été largement étudiée dans le contexte de l'hypertension pulmonaire et qu'on lui ait prêté un rôle protecteur, une étude a attribué au VEGF-B un rôle pathologique. A l'inverse du VEGF-A, le VEGF-B semble accentuer le remodelage puisque des souris invalidées pour VEGF-B (VEGF-B<sup>-/-</sup>) exposées à une hypoxie

chronique, ont un remodelage vasculaire significativement moindre par comparaison aux souris sauvages (205). Des études animales ont montré les effets positifs du VEGF-A dans des modèles d'hypertension pulmonaire (206). En effet, une thérapie cellulaire fondée sur l'utilisation de cellules musculaires lisses syngéniques surexprimant le VEGF-A a permis de prévenir le développement et la progression de l'HTAP dans le modèle de rats exposés à la monocrotaline (206). Le VEGF-A réduirait la progression de la maladie en prévenant la perte des vaisseaux existants ou en induisant le développement de nouveaux vaisseaux pulmonaires (206). Dans l'HTAP idiopathique, l'expression du VEGFR-1 est augmentée, alors que c'est VEGFR-2 qui est exprimé dans les lésions plexiformes (207). Chez le rat, il a été montré que l'association du blocage chronique du VEGFR-2 et de l'hypoxie chronique pouvait causer une dysfonction cellulaire endothéliale et une mort cellulaire permettant de sélectionner un phénotype endothélial prolifératif et résistant à l'apoptose et conduisant au développement d'une hypertension pulmonaire (201). Puisque la mort cellulaire endothéliale, la prolifération cellulaire et le développement de l'hypertension pulmonaire sont bloqués par un inhibiteur des caspases à large spectre, il ressort que la sélection parmi les cellules endothéliales d'un phénotype résistant à l'apoptose pourrait être essentielle à la prolifération des cellules endothéliales des artères pulmonaires (201). Des phénomènes apoptotiques pourraient être à l'origine d'une susceptibilité au développement des maladies vasculaires (201).

**Figure 9 :** VEGF et les récepteurs au VEGF (d'après (203))



#### 1.4.6.4.2 Le PDGF

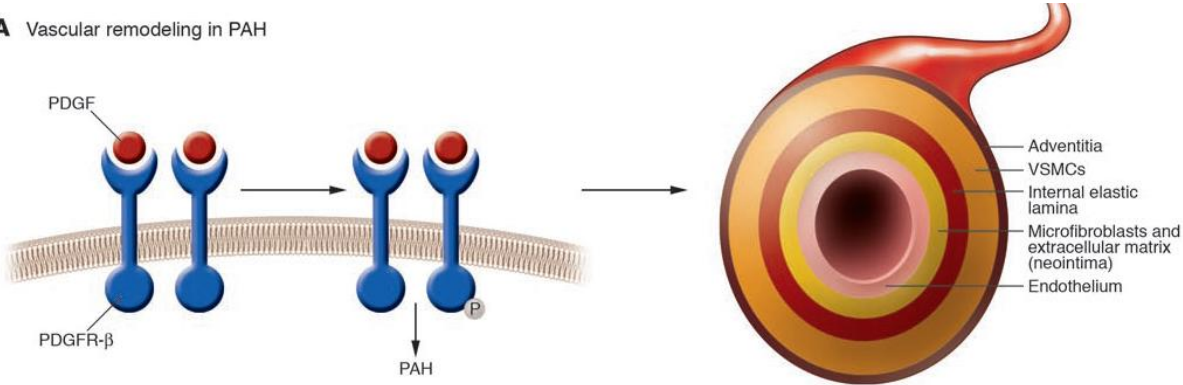
Le PDGF est formé à partir de 2 chaînes polypeptidiques (les chaînes A et B) qui forment un homo ou un hétérodimère. Le PDGF est synthétisé par plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les macrophages (208, 209). Le PDGF a la capacité de stimuler la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et représente un médiateur clé dans la progression de plusieurs maladies fibroproliférantes telles l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire et l'HTAP (208, 209). Le PDGF et ses récepteurs (PDGF-R $\alpha$  et  $\beta$ ), présents dans leur forme activée phosphorylée, sont surexprimés au sein des artérioles pulmonaires de patients transplantés pour une HTAP idiopathique sévère (72). Au sein des artérioles, le PDGF-B est principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et au sein des cellules inflammatoires périvasculaires ; le PDGF-R $\beta$  est principalement exprimé dans les cellules musculaires lisses (72). De plus, il a été montré que le PDGF joue un rôle important dans la

prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (72). Cette action est inhibée par les inhibiteurs de tyrosine kinase et en particulier l'imatinib (72, 209). Un certain nombre d'observations cliniques ont soulevé l'hypothèse que les agents capables de moduler l'effet du PDGF pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans la prise en charge de l'HTAP (210, 211).

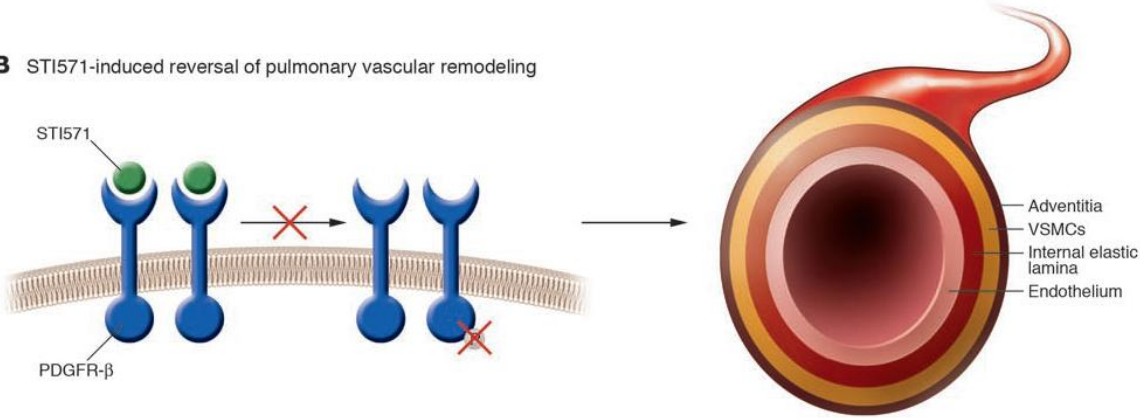
L'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinases qui a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique pour sa capacité à bloquer le récepteur bcr-abl anormal. L'imatinib est capable de reverser l'HTAP induite dans des modèles expérimentaux (72, 209). De plus, il a été rapporté chez quelques patients suivis pour une HTAP et ayant reçu de l'imatinib à titre compassionnel ou dans le cadre du traitement d'une leucémie myéloïde chronique, une amélioration fonctionnelle et hémodynamique (210, 211). L'effet de l'imatinib pourrait être dû en partie à une inhibition de l'activité de plusieurs tyrosine kinases, dont le récepteur du PDGF, conduisant à une apoptose des cellules musculaires lisses et un effet sur le remodelage vasculaire pulmonaire. Les inhibiteurs de tyrosine kinase ayant des cibles multiples, il est possible que l'action de l'imatinib soit aussi liée à l'inhibition d'autres récepteurs tyrosine kinase. Une étude clinique récente multicentrique de phase II a étudié l'effet de l'imatinib sur 59 patients atteints d'HTAP ayant présenté une réponse insatisfaisante au traitement par analogues de la prostacycline, antagoniste des récepteurs de l'endothéline ou inhibiteur de la PDE-5 (212). L'objectif primaire qui visait à étudier l'effet fonctionnel du traitement sur le test de marche n'a pas été atteint (212). Une étude randomisée de phase III, contre placebo, visant à étudier l'effet de l'imatinib est en cours. D'autres inhibiteurs de tyrosine kinases dont les cibles biologiques sont variables sont également en cours d'évaluation.

**Figure 10:** Voie du PDGF dans le remodelage vasculaire pulmonaire et son inhibition par le STI571.

**A** Vascular remodeling in PAH



**B** STI571-induced reversal of pulmonary vascular remodeling



#### 1.4.6.4.3 Angiopoïétine et TIE2

L'angiopoïétine-1 (Ang-1) est une glycoprotéine qui forme avec l'angiopoïétine 2 et 3/4 une famille de facteurs de croissance. Elle exerce ses effets physiologiques après fixation à un récepteur transmembranaire spécifique endothélial à tyrosine kinase TIE2. Au cours du développement pulmonaire, Ang-1 et TIE2 sont exprimés dans les vaisseaux en croissance. Ang-1 est synthétisé et sécrété par les cellules musculaires lisses vasculaires et les péricytes, alors que TIE2 est exprimé sur les cellules endothéliales. Chez l'adulte, l'expression d'Ang-1 est minimale alors que celle de TIE2 demeure constitutive. Au cours de l'HTAP, Ang-1 est surexprimée (213) et Ang-1 cause l'activation du récepteur TIE2 par autophosphorylation d'une tyrosine dans l'endothélium vasculaire pulmonaire (214). Enfin, TIE2 et sa forme phosphorylée sont surexprimés dans les poumons de sujets transplantés pour une HTAP comparativement à des sujets contrôles (215). La surexpression d'Ang-1 au niveau pulmonaire est capable d'induire une HTAP chez le rat (214, 216). Les animaux transgéniques pour Ang-1 présentent une augmentation de la phosphorylation de TIE2 au niveau endothélial pulmonaire et une hyperplasie des cellules musculaires lisses au niveau des artérioles pulmonaires. Une surexpression de l'ectodomaine soluble de TIE2 qui séquestre l'Ang-1 est capable de supprimer le phénotype hypertensif pulmonaire dans des modèles animaux d'HTAP induite par la monocrotaline ou Ang-1 (217). Enfin, la stimulation des cellules endothéliales pulmonaires par Ang-1 induit un relargage de sérotonine qui peut potentiellement stimuler les cellules musculaires lisses vasculaires (214, 215). Toutefois, ce rôle d'Ang-1 est controversé ; Zhao et coll ont en effet montré qu'Ang-1 pouvait avoir un rôle protecteur contre le développement d'une HTAP dans des modèles animaux d'HTAP induite par la monocrotaline ou l'hypoxie (218).

## **2 MATERIEL ET METHODES**

### **2.1 Prélèvements humains**

#### **2.1.1 Patients**

Les études ont été réalisées à partir de prélèvements de parenchyme pulmonaire et d'artères pulmonaires obtenus au cours de transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire de patients souffrant d'HTAP et suivis dans le Centre National de Référence de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire à l'hôpital Antoine Bécclère et à l'hôpital Européen Georges Pompidou. Le diagnostic d'HTAP était confirmé chez tous les patients par cathétérisme cardiaque droit, la condition associée (idiopathique, héritable...) était confirmée selon les recommandations internationales en vigueur (1, 219). L'indication de transplantation était posée après discussion collégiale médico-chirurgicale chez des patients atteints d'HTAP sévère et réfractaire au traitement médical optimal.

Le tissu contrôle provenait de biopsies pulmonaires effectuées lors de la cure chirurgicale de pneumothorax ou au cours de lobectomies ou pneumonectomies réalisées pour l'exérèse d'un cancer bronchique. Une échocardiographie pré-opératoire éliminait une hypertension pulmonaire chez chacun de ces sujets contrôle.

L'ensemble des prélèvements (transplantations, lobectomies, pneumonectomies, biopsies pulmonaires) a été effectué au Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Pr Ph Darteville et Pr E Fadel).

Un consentement libre et éclairé a été obtenu auprès des patients ou de leur famille avant chaque prélèvement afin qu'il soit utilisé à des fins de recherche médicale.

### 2.1.2 Traitement du tissu humain

Afin de garantir l'intégrité nucléaire, protéique et morphologique des tissus utilisés, le parenchyme pulmonaire prélevé par le chirurgien était traité rapidement et stérilement au moment même de l'intervention chirurgicale au bloc opératoire.

Lors des transplantations, le poumon droit natif explanté est gonflé à l'aide d'un mélange d'ornithyl carbamyl transferase (OCT, VWR) et de phosphate buffered saline (PBS) dans un rapport 1 :5, par application intrabronchique ; chaque lobe étant gonflé via sa bronche principale. Quand le lobe est suffisamment distendu, la bronche est ligaturée. Lorsqu'un lobe pulmonaire entier ne peut-être obtenu (prélèvements contrôles), le mélange OCT-PBS est directement injecté dans le parenchyme pulmonaire à l'aide d'une aiguille 18G. De multiples prélèvements tissulaires sont obtenus en sectionnant différentes zones du parenchyme pulmonaire (tissu prélevé en zone saine à distance d'une tumeur pour les sujets contrôles) : des échantillons périphériques et centraux des 3 lobes sont récupérés et numérotés de façon systématique. Les échantillons sont inclus dans de l'OCT pur dans des cupules de congélation puis rapidement congelés dans un bain d'isopentane refroidi par de la carboglace. Les blocs de tissu pulmonaire ainsi obtenus sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Dans le même temps une collerette d'artère pulmonaire est disséquée séparément, placée dans du milieu de transport DMEM et stockée pendant un temps maximum de 48 heures à +4°C. Les cellules musculaires lisses sont ensuite recueillies par la technique d'explant décrite plus loin.

### 2.1.3 Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins en vue de l'obtention des plaquettes et de monocytes ont été effectués chez des patients adultes. Les prélèvements étaient effectués le matin, après avoir respecté 30 min de stabilisation en position assise ou couchée. Les plaquettes étaient isolées



localement par le centre investigateur (service de pneumologie hôpital Antoine Béclère, CIC hôpital Henri Mondor) puis congelées. Les monocytes étaient isolés à partir de sang frais non congelé et ni réfrigéré sur un gradient de Ficoll.

Les prélèvements sanguins en vue de l'extraction de l'ADN génomique ont été effectués par le centre investigateur (service de pneumologie hôpital Antoine Béclère, CIC hôpital Henri Mondor) pour être ensuite congelés et stockés jusqu'à l'extraction et l'analyse de l'ADN génomique.

#### 2.1.4 Culture des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Les cellules musculaires lisses (CML) d'artère pulmonaire sont cultivées à partir d'explants. Les artères pulmonaires prélevées (5 à 10 mm de diamètre) sont placées dans du milieu de transport DMEM et stockées au plus 48 heures à + 4°C. Au moment de la mise en culture, le vaisseau est ouvert, rincé et nettoyé de tout tissu conjonctif, il est ensuite découpé en petits lambeaux de 2 à 5 mm<sup>2</sup> qui sont placés dans une boîte de culture et incubés en présence de milieu de culture DMEM complété avec des antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de gentamycine), 1% de fungizone, 1% de L-glutamine et 10% sérum de veau foetal (SVF). Après 2 semaines d'incubation, les CML sont transférées dans de nouvelles boîtes de culture. Arrivées à confluence, les CML sont utilisées entre les passages 1 et 4.

Afin de déterminer les caractéristiques phénotypiques des CML en culture des patients HTAP et contrôles, un immunomarquage utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine spécifique du cyto-squelette des CML (alpha-actine) est réalisé.

#### 2.1.5 Culture des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont obtenues par digestion enzymatique (Dispase I) d'un fragment de tissu pulmonaire de 5 cm<sup>3</sup> placé à 37°C pendant une nuit. La suspension

obtenue est alors filtrée, et placée sur des puits enduits de gélatine (0.1%) et placé dans un milieu spécifique (MCDB131 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 50 U/mL de penicilline/streptomycine, 4 mmol/L de L-glutamine, 25 mmol/L d'HEPES, 10 U/mL d'héparine, et des facteurs de croissances endothéliaux (VEGF). Une purification immunomagnétique est ensuite réalisée à l'aide de microbilles (DynaBeads (Dyna, Compiègne, France)) marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-PECAM (CD31). Le phénotype endothélial était contrôlé par un double marquage avec LDL acétylé couplé à un marqueur fluorescent (carbocyanine) (Dil-Ac-LDL, Tebu, Le Perray en Yvelines, France) et un anticorps endothélial spécifique (*Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA-1, Sigma, Lyon, France). Les expériences sont répétées en utilisant des anticorps monoclonaux anti-desmine et anti-vimentine (Dako, Trappes, France). Les cellules positives pour Dil-Ac-LDL et UEA-1 et négatives pour la desmine et la vimentine correspondent aux cellules endothéliales et étaient utilisées entre les passages 3 et 6.

### **3 TRAVAUX DE RECHERCHE**

### **3.1 Première étude**

#### **Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia in Various Forms of Human Pulmonary Hypertension**

Elisabeth Marcos, Elie Fadel, Olivier Sanchez, Marc Humbert, Philippe Dartevelle, Gérald

Simonneau, Michel Hamon, Serge Adnot, Saadia Eddahibi

Circ Res 2004;94:1263-1270

L'hypertension pulmonaire est caractérisée par un intense remodelage de la microcirculation pulmonaire responsable de l'élévation permanente des résistances vasculaires. Ces anomalies anatomopathologiques sont rencontrées aussi bien dans l'HTAP idiopathique, dans l'HTAP associée à diverses conditions (connectivites, infection par le VIH...), mais également dans l'HTP compliquant l'évolution des insuffisances respiratoires chroniques hypoxémiantes (groupe 3 de la classification de l'OMS) ou encore l'hypertension pulmonaire post-embolique chronique (groupe 4 de l'OMS). Des mécanismes physiopathologiques communs pourraient être impliqués dans la genèse de ce remodelage microvasculaire pulmonaire. Des études antérieures ont souligné le rôle majeur de la sérotonine au cours de l'HTAP idiopathique. Toutefois, le rôle respectif du transporteur de la sérotonine (5-HTT) ou de ses récepteurs (5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub>) demeure incertain ainsi que le rôle de la sérotonine dans le remodelage vasculaire pulmonaire mis en évidence dans l'HTP associée à diverses conditions.

Les buts de cette étude étaient donc : (1) évaluer l'expression du 5-HTT et des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub> dans le parenchyme pulmonaire et des cellules musculaires lisses (CML) d'artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP idiopathique (anciennement *primary pulmonary hypertension (PPH)* dans l'article), d'HTP compliquant l'évolution de sclérodermie, histiocytose X, sarcoïdose, drépanocytose, d'une insuffisance respiratoire chronique sévère (dilatation des bronches, emphysème) (*secondary pulmonary hypertension (SPH)* dans l'article), de maladie veino-occlusive, et de sujets contrôles indemnes d'HTP ; (2) d'évaluer les rôles respectifs du 5-HTT et des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub> à l'aide d'inhibiteurs et d'antagonistes sélectifs spécifiques sur la prolifération des CML.

### *3.1.1 Principaux résultats*

#### *3.1.1.1 Expression pulmonaire du 5-HTT et des récepteurs de la sérotonine en immunohistochimie*

Dans les poumons de sujets contrôles, le 5-HTT et les récepteurs 5-HT<sub>1B</sub> et 5-HT<sub>2A</sub> sont principalement exprimés dans la média des artérioles pulmonaires et de façon beaucoup plus faible au niveau de l'endothélium. Le récepteur 5-HT<sub>2B</sub> est exprimé au niveau de l'endothélium et de la média. Comparativement aux contrôles, une surexpression du 5-HTT était mise en évidence dans la média des artérioles pulmonaires remodelées des patients avec une HTAP idiopathique et associée. L'expression du 5-HTT était significativement augmentée dans le groupe HTAP idiopathique comparativement aux HTAP associée. En revanche, l'expression pulmonaire des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub> était similaire dans la média des artérioles pulmonaires de ces 3 groupes.

#### *3.1.1.2 Expression de l'ARNm du 5-HTT et des récepteurs de la sérotonine dans les CML*

Les CML d'artère pulmonaire de patients avec une HTAP idiopathique, associée à une pathologie ou une maladie veino-occlusive exprimaient un niveau similaire d'ARNm des récepteurs 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>2B</sub> que les sujets contrôles. En revanche, les CML d'HTAP idiopathique ou de maladie veino-occlusive exprimaient un niveau significativement supérieur d'ARNm du 5-HTT que les sujets contrôles ou les HTAP associées à une pathologie.

#### *3.1.1.3 Prolifération des CML*

La sérotonine stimulait de façon significativement supérieure la prolifération des CML d'HTAP idiopathique, de maladie veino-occlusive et d'HTAP associée que les CML contrôles. La réponse mitogénique à la sérotonine était significativement plus importante dans les

groupes HTAP idiopathique et maladie veino-occlusive que dans les HTAP associée. Les effets mitogènes de la sérotonine sur les CML étaient bloqués par les inhibiteurs sélectifs du 5-HTT tels la fluoxétine ou le citalopram mais pas par des antagonistes des récepteurs de la sérotonine tels la kétansérine (antagoniste du 5-HT<sub>2A</sub>), RS127445 (5-HT<sub>2B/2C</sub>) et GR127935 (5-HT<sub>1B/1D</sub>). En revanche, la réponse proliférative au PDGF était similaire dans les 3 groupes et les contrôles.

#### *3.1.1.4 Expression du 5-HTT dans les CML en fonction du génotype*

L'allèle long « L » de la région promotrice du gène codant pour le 5-HTT, qui est associé à une surexpression du 5-HTT, était présent à l'état homozygote chez 14/25 (56%) des patients atteints d'HTAP associée mais seulement 23/84 (27%) des sujets contrôles. Le niveau d'expression de l'ARNm du 5-HTT et son activité dans les CML étaient significativement augmentés dans les CML de génotype L/L comparativement aux autres génotypes (L/S et S/S). Cette différence était observée pour les CML de contrôles et de patients avec HTAP idiopathique. Toutefois, pour un même génotype, l'expression de l'ARNm du 5-HTT demeurait significativement plus élevée dans les CML d'HTAP idiopathique sans que cela soit expliqué par la présence d'autres mutations dans les régions régulatrices du gène codant pour le 5-HTT.

#### *3.1.2 Conclusions*

Les résultats de cette première étude montrent qu'une surexpression du 5-HTT dans les CML d'artère pulmonaire est une voie physiopathologique impliquée dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP idiopathique, la maladie veino-occlusive et l'HTAP associée à différentes pathologies.

## **3.2 Deuxième étude**

### **Role of Endothelium-derived CC Chemokine Ligand 2 in**

#### **Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension**

Olivier Sanchez, Elisabeth Marcos, Frédéric Perros, Elie Fadel, Ly Tu, Marc Humbert,

Philippe Dartevelle, Gérald Simonneau, Serge Adnot, Saadia Eddahibi

Am J Respir Crit Care Med 2007;176:1041-1047



Des mécanismes inflammatoires jouent probablement un rôle important dans la physiopathologie du remodelage microvasculaire pulmonaire rencontré au cours de l'HTAP. Des infiltrats composés de cellules inflammatoires mononucléées correspondant à des macrophages, des lymphocytes T et B et des cellules dendritiques sont fréquemment mis en évidence autour des lésions vasculaires pulmonaires de patients présentant une HTAP idiopathique. Les mécanismes impliqués dans le recrutement de ces cellules mononucléées demeurent mal compris. Une étude précédente de notre équipe avait montré que des cellules endothéliales pulmonaires en culture étaient capables de synthétiser et libérer des facteurs de croissance (5-HT, ET-1...) qui agissaient sur les cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires de manière paracrine (157). *CC chemokine ligand 2* (CCL2, anciennement dénommée *monocyte chemoattractant protein 1* [MCP1]) est une chimiokine impliquée dans l'activation et la migration des monocytes/macrophages, et dans un grand nombre de maladies inflammatoires dont l'athérosclérose. Notre intérêt pour cette chimiokine était également fondé sur les résultats d'une étude antérieure rapportant un effet préventif de l'administration d'anticorps et d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre CCL2 sur le remodelage vasculaire pulmonaire chez des rats exposés à la monocrotaline (220).

Les buts de cette étude étaient donc : (1) évaluer l'expression de CCL2 circulante dans le plasma, le poumon et la synthèse de CCL2 par les monocytes circulants, les cultures de cellules endothéliales pulmonaires et de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires ; (2) évaluer les effets de CCL2 sur la migration de monocytes et la prolifération et la migration de CML dans l'HTAP idiopathique en comparaison avec des sujets contrôles indemnes d'HTAP.

### 3.2.1 Principaux résultats

#### 3.2.1.1 *Concentration de CCL2 plasmatique*

Un groupe de 44 patients (30 femmes, âge moyen  $46 \pm 15$  ans) porteurs d'une HTAP idiopathique (PAPm  $52 \pm 12$  mmHg, RVPI  $28.3 \pm 9$  UWood/m<sup>2</sup>) et de 17 volontaires sains (10 femmes, âge moyen  $47 \pm 8$  ans) ont été inclus. La concentration de CCL2 plasmatique était significativement plus élevée chez les patients avec une HTAP idiopathique que chez les contrôles ( $504 \pm 36$  contre  $317 \pm 22$  pg/mL ;  $p=0.002$ ). Le niveau de CCL2 circulant n'était pas corrélé à la sévérité hémodynamique et n'était pas modifié significativement par l'administration chronique de prostacycline intraveineuse dans un sous-groupe de 9 patients ( $446 \pm 50$  (avant) contre  $505 \pm 60$  pg/mL (après Pgl<sub>2</sub>) ;  $p=0.76$ ). Enfin, cette augmentation de la concentration plasmatique de CCL2 chez les patients avec une HTAP idiopathique n'était pas due à une augmentation de production par les monocytes circulants de ces patients ( $295 \pm 30$  pg/10<sup>6</sup> monocytes de patients HTAP contre  $212 \pm 42$  pg/10<sup>6</sup> monocytes contrôles ;  $p=0.17$ ).

#### 3.2.1.2 *Expression pulmonaire de CCL2*

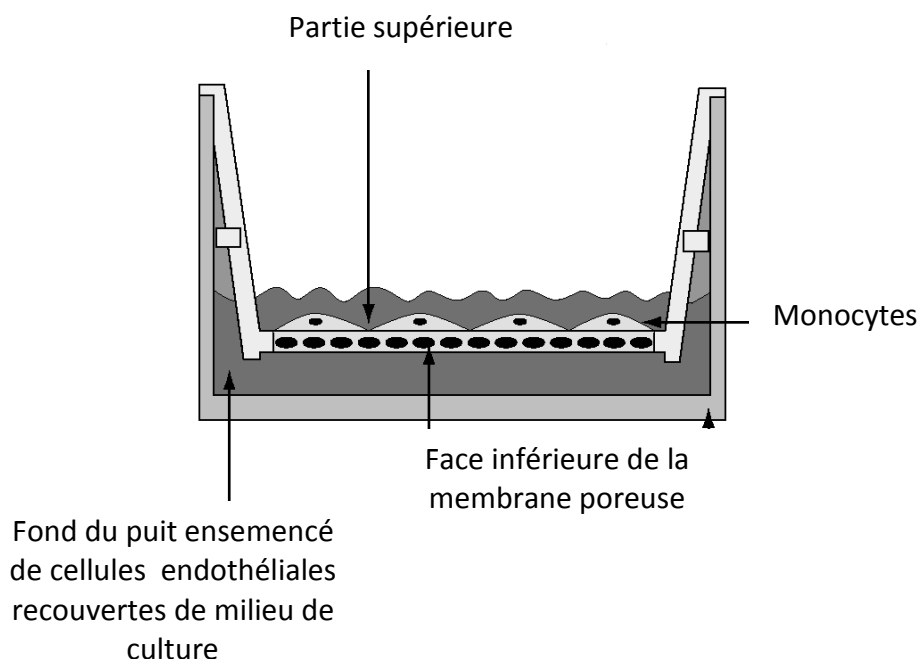
Les concentrations pulmonaires de CCL2, mesurées en Western Blot et en ELISA, étaient significativement augmentées dans les poumons de patients avec une HTAP idiopathique comparativement aux contrôles. En immunohistochimie, l'immunomarquage pour CCL2 était localisé au niveau des cellules endothéliales, des macrophages alvéolaires et des infiltrats perivasculaires. Il n'était pas détecté d'immunomarquage pour CCL2 dans la média des artérioles pulmonaires.

### *3.2.1.3 Expression de CCL2 dans les cultures de cellules endothéliales et musculaires lisses artérielles pulmonaires*

Les concentrations de CCL2 mesurées dans le milieu de culture de cellules endothéliales et musculaires lisses quiescentes étaient significativement augmentées chez les patients avec une HTAP idiopathique comparativement aux contrôles (respectivement  $1293 \pm 50$  pg/ $10^5$  contre  $623 \pm 163$  pg/ $10^5$  cellules endothéliales,  $p=0.02$  ; et  $1278 \pm 163$  pg/ $10^5$  contre  $336 \pm 129$  pg/ $10^5$  cellules musculaires lisses,  $p=0.01$ ). Les niveaux de CCL2 étaient quatre fois plus élevés dans les milieux de culture de cellules endothéliales que musculaires lisses dans les deux groupes.

### *3.2.1.4 Effets de CCL2 synthétisé par les cellules endothéliales sur la migration des monocytes*

Nous avons utilisé des chambres de Boyden modifiées dans lesquelles des cellules endothéliales de patients avec une HTAP idiopathique ou de sujets contrôles étaient ensemencées dans la partie inférieure du puit (cf schéma ci-dessous). Des monocytes isolés chez des contrôles étaient ensemencés dans la partie supérieure de la chambre qui était ensuite plongée dans le puit au contact du milieu de culture qui recouvrait les cellules endothéliales. La migration des monocytes était ensuite mesurée en quantifiant le nombre de monocytes ayant traversé la membrane percée de pores.



La présence de cellules endothéliales dans le fond du puit stimulait la migration des monocytes à travers les pores de la membrane. Cet effet était significativement plus important lorsque des cellules endothéliales de patients avec une HTAP idiopathique étaient utilisées comparativement aux cellules contrôles. La migration des monocytes était également fortement stimulée lorsque les cellules endothéliales étaient remplacées par du CCL2 (10 ng/mL). La migration des monocytes était fortement réduite (-60%) en présence d'anticorps anti-CCL2 introduit dans le milieu de culture des cellules endothéliales ou le CCL2 exogène.

### 3.2.1.5 Effets de CCL2 sur la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses

CCL2 stimulait la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de façon dose dépendante. Ces effets étaient significativement plus importants avec des cellules de patients ayant une HTAP idiopathique comparativement aux contrôles.

### *3.2.1.6 Expression de l'ARNm du récepteur de CCL2 : CCR2*

L'expression de l'ARNm de CCR2 était significativement plus importante dans les monocytes que les cellules endothéliales et musculaires lisses de patients avec une HTAP idiopathique et de contrôles. L'expression de l'ARNm de CCR2 était significativement augmentée dans les cellules endothéliales et musculaires lisses de patients avec une HTAP idiopathique comparativement aux contrôles alors qu'elle était comparable pour les monocytes.

### *3.2.2 Conclusions*

Les résultats de cette seconde étude montrent que CCL2 est surexprimée au cours de l'HTAP idiopathique. La source de cette surexpression semble provenir des cellules endothéliales pulmonaires. CCL2 agit non seulement sur le recrutement des monocytes mais également sur les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires en stimulant leur prolifération et leur migration.

### **3.3 Troisième étude**

**Altération de la Voie de l'Endothéline au Cours de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire**

**Idiopathique et Héritable**

### 3.3.1 Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare caractérisée par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires liée à un remodelage de la microcirculation pulmonaire. Une dysfonction et une prolifération anormale des cellules endothéliales et musculaires lisses artérielles pulmonaires jouent un rôle important dans la physiopathologie de cette maladie. Les mécanismes à l'origine de ces anomalies demeurent encore mal compris.

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide de 21 acides aminés synthétisé principalement par la cellule endothéliale sous forme de précurseur qui subit des clivages successifs pour aboutir au peptide biologiquement actif (105). Les effets de l'ET-1 sont médiés par deux récepteurs différents couplés à des protéines G ET-A et ET-B (105). De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle de la voie de l'endothéline dans la physiopathologie de l'HTAP. Chez les sujets atteints d'HTAP, des concentrations élevées (de l'ordre de 3.5 pg/mL) ont été mises en évidence alors qu'elles sont physiologiquement très faibles chez l'adulte sain (de l'ordre de 1 à 2 pg/mL) (122). Les concentrations plasmatiques d'ET-1 sont corrélées à plusieurs paramètres de gravité de l'HTAP (124). L'expression pulmonaire de l'ET-1 et de son ARNm est augmentée dans les poumons de sujets atteints d'HTAP (123). Dans l'HTAP expérimentale induite par l'hypoxie ou la monocrotaline, des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 permettent de diminuer ou faire régresser l'HTAP et le remodelage vasculaire pulmonaire (111, 221, 222). Enfin, plusieurs essais randomisés contre placebo ont démontré que l'utilisation d'antagonistes non sélectif (bosentan) ou sélectif d'ET-A (sitaxentan, ambrisentan) chez des patients atteints d'HTAP du groupe 1 améliore significativement les performances à l'effort et les symptômes (125-127).

Des mutations germinales dans le gène codant pour un récepteur de type II, le BMPR-II, un membre des récepteurs de la famille du TGF- $\beta$ , ont été identifiées chez près de 70% des cas d'HTAP héritable et 10 à 30% des cas d'HTAP idiopathique sporadique (9, 129). A ce jour, environ 144 mutations différentes dispersées sur tout le gène ont été identifiées (130). Environ 30% de ces mutations surviennent dans des séquences hautement conservées d'acides aminés et modifiant ainsi de façon prédictible la fonction du récepteur. Cependant, la majorité (environ 70%) des mutations sont des mutations non sens conduisant dans la majorité des cas à la production d'un transcript non sens. Ainsi, l'insuffisance haploïde représente le mécanisme moléculaire prédominant pour la survenue de l'HTAP héritable (130).

Il n'est pas connu si la dysfonction des voies de signalisation secondaire aux mutations de BMPR-II rencontrées au cours de l'HTAP héritable pourrait avoir des conséquences sur la voie de l'ET-1. Le but de cette étude était d'évaluer la voie de l'endothéline chez des patients souffrant d'HTAP idiopathique sporadique, d'HTAP héritable avec mutation du gène codant pour BMPR-II et des sujets contrôles en mesurant (1) la synthèse d'ET-1 dans le tissu pulmonaire, dans le milieu de culture des cellules endothéliales (CE) et musculaires artérielles pulmonaires (CML), (2) l'expression des récepteurs ET-A et ET-B dans les CML et enfin, (3) l'effet d'ET-1 sur la prolifération des CML.

### 3.3.2 Matériel et méthodes

#### 3.3.2.1 *Patients*

Les études ont été réalisées à partir de prélèvements de parenchyme pulmonaire et d'artères pulmonaires obtenus au cours de transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire de 10 patients souffrant d'HTAP idiopathique sans mutation BMPR-II (HTAPi) et



7 patients souffrant d'HTAP héritable (HTAPh) avec une mutation pour BMPR-II, et de pièce de lobectomie ou de pneumonectomie réalisée pour l'exérèse d'un cancer pulmonaire chez 10 sujets contrôles. Le diagnostic d'HTAP était confirmé chez tous les patients par cathétérisme cardiaque droit, selon les recommandations internationales en vigueur (1, 219). Une échocardiographie pré-opératoire éliminait la présence d'une HTAP chez les sujets contrôles. L'âge moyen (moyenne  $\pm$  écart type) était  $32\pm 13$  ans pour les patients avec une HTAPi,  $39\pm 8$  ans pour les patients avec une HTAPh et  $45\pm 8$  ans pour les contrôles. La pression artérielle pulmonaire moyenne était de  $67\pm 16$  mmHg dans le groupe HTAPi et  $61\pm 10$  mmHg dans le groupe HTAPh. Tous les patients recevaient de la prostacycline, 5 et 4 patients avec une HTAPi et HTAPh recevaient du bosentan au moment de la transplantation.

### *3.3.2.2 Recherche de mutations sur le gène codant pour BMPRII*

Les mutations dans le gène codant pour BMPR2 dans les prélèvements pulmonaires de patients avec une HTAPi et une HTAPh ont été recherchées comme précédemment décrit (5, 6). Brièvement, les séquences correspondant aux exons 1-13 du gène étaient amplifiées à partir d'échantillons d'ADN génomique par PCR avec des primers spécifiques (223). Les produits de PCR étaient séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1%) et purifiés à l'aide d'un kit spécifique (QIAquick PCR purification kit ; QIAGEN). Les produits de PCR étaient ensuite séquencés (ABI PRISM 377, Perkin-Elmer Applied Biosystem).

### *3.3.2.3 Extraction de l'ARN et préparation de l'ADNc*

Les ARNs pulmonaires totaux étaient extraits d'après la méthode décrite par Chomczynski et coll (224), en utilisant du TRIzol Reagent (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Les ARNs totaux étaient extraits des CE et des CML grâce à un kit d'extraction commercial Qiagen RNeasy Mini kit (QIAGEN S.A., Courtabeuf, France), en accord avec les instructions du

fournisseur. Ce kit d'extraction comporte deux grandes étapes. Une première colonne d'exclusion permet d'éliminer les débris cellulaires et l'ADN génomique. Une deuxième colonne en silice permet de retenir les ARNs totaux par affinité électrostatique. Ce kit permet l'obtention d'ARN total pur et de grande qualité. Ces deux paramètres étaient vérifiés après chaque extraction par spectrophotométrie et visualisation après migration sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. L'ARN pur possède un rapport absorption à 260 nm / absorption à 280 nm entre 1.8 et 2. Un ARN non dégradé présente deux bandes intenses et uniques correspondant aux ARN 18S et 28S. La transformation des ARNs en ADNc complémentaires (ADNc) par rétrotranscription a été réalisée grâce à un kit commercial (SuperScript II Reverse Transcriptase System (Life Technologies, Inc.)). Une première étape de digestion de l'ADN génomique dont il peut subsister des traces, même après l'étape précédente d'exclusion. Une deuxième étape de rétrotranscription utilise un mélange d'oligonucléotides dégénérés et de poly-dT. Un  $\mu\text{g}$  d'ARNs totaux, 2  $\mu\text{l}$  de mélange de deoxynucleotide triphosphate (10 mM), et 100 ng de primers dans un volume total de 12  $\mu\text{l}$  étaient incubés pendant 5 min à 65°C et refroidi sur de la glace. 4  $\mu\text{l}$  de 1st Strand Buffer, 2  $\mu\text{l}$  de DTT (0.1 M) et 40U d'inhibiteur de ribonucléase (RNase-Out, Invitrogen, Carlsbad, CA) étaient ajoutés aux échantillons et chauffés à 42°C pendant 2 min. Enfin, après adjonction d'1  $\mu\text{l}$  de SuperScript reverse transcriptase II (200 unités/ $\mu\text{l}$ ), la réaction était incubée pendant 10 min à 25°C, 50 min à 42°C et 15 min à 70°C. L'ADNc était dilué au 1:20 pour l'utilisation de PCR en temps réel.

### 3.3.2.4 *PCR quantitative en temps réel (RTQ-PCR) pour la mesure des ARNm d' ET-1, ECE-1, ET-A et ET-B*

Les primers de RTQ-PCR étaient construits (Primer Express Software, Applied Biosystems) pour l'ET-1, ECE-1, ET-A, ET-B, Cerebrus, DAN, Gremlin, PRDC et ARNr 18S, comme gène domestique. Les RTQ-PCR ont été réalisées sur un "ABI Prism 7000" (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) et répétées trois fois, dans un mélange de 12.5 µl de « Sybr Green PCR Master Mix » (Applied Biosystems; Warrington, UK), 300 nM (de chaque) primer et 12.5 ng d'ADN template dans un volume total de 25 µl. La RTQ-PCR était réalisée en utilisant les paramètres suivants : 40 cycles de dénaturation (15 s; 95°C) et élongation (1 min; 60°C). L'expression des gènes d'intérêt était quantifiée selon la méthode relative du  $\Delta\Delta C_t$ . L'ARN ribosomal 18S était utilisé comme contrôle interne de la quantité réelle d'ADNc déposée dans chaque réaction de PCR. Le gène cible normalisé par rapport à l'ARNr 18S correspond à  $\Delta C_t$  ( $C_t$  du gène d'intérêt –  $C_t$  de l'ARNr 18S). La différence d'expression de chaque échantillon est donnée par la différence  $\Delta\Delta C_t$  ( $\Delta C_t$  de l'échantillon -  $\Delta C_t$  d'un échantillon qui sert de référence). Enfin, la quantité relative de chaque échantillon est donnée par l'équation  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.3.2.5 *Extraction protéique du tissu pulmonaire*

Les protéines étaient extraites du tissu pulmonaire après homogénéisation de 300 mg de tissu pulmonaire dans un volume approprié de tampon (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) dans du PBS). La solution était centrifugée à 4°C pendant 20 minutes à 2500 rpm. Le surnageant était récupéré et immédiatement congelé et stocké à -80°C jusqu'au dosage.

### 3.3.2.6 Culture de cellules musculaires d'artère pulmonaire (CML) et de cellules endothéliales pulmonaires (CE)

Les cellules musculaires lisses (CML) d'artère pulmonaire étaient cultivées à partir d'explants. Les artères pulmonaires prélevées (5 à 10 mm de diamètre) étaient placées dans du milieu de transport DMEM et stockées au plus 48 heures à + 4°C. Au moment de la mise en culture, le vaisseau était ouvert, rincé et nettoyé de tout tissu conjonctif, il était ensuite découpé en petits lambeaux de 2 à 5 mm<sup>2</sup> qui étaient placés dans une boîte de culture et incubés en présence de milieu de culture DMEM complété avec des antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de gentamycine), 1% de fungizone, 1% de L-glutamine et 10% sérum de veau fœtal (SVF). Après 2 semaines d'incubation, les CML étaient transférées dans de nouvelles boîtes de culture. Afin de déterminer les caractéristiques phénotypiques des CML en culture des patients HTAP et contrôles, un immunomarquage utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine spécifique du cyto-squelette des CML (alpha-actine) était réalisé. Arrivées à confluence, les CML étaient utilisées entre les passages 1 et 4.

Les cellules endothéliales étaient obtenues par digestion enzymatique (Dispase I) d'un fragment de tissu pulmonaire de 5 cm<sup>3</sup> placé à 37°C pendant une nuit. La suspension obtenue était alors filtrée, et placée sur des puits enduits de gélatine (0.1%) et placé dans un milieu spécifique (MCDB131 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/mL de penicilline/streptomycine, 4 mmol/L de L-glutamine, 25 mmol/L d'HEPES, 10 U/mL d'héparine, et des facteurs de croissances endothéliaux (VEGF). Une purification immunomagnétique était ensuite réalisée à l'aide de microbilles (DynaBeads (Dynal, Compiègne, France)) marquées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-PECAM (CD31). Le phénotype endothélial était contrôlé par un double marquage avec LDL acétylé couplé à un marqueur fluorescent (carbocyanine) (DiI-Ac-LDL, Tebu, Le Perray en

Yvelines, France) et un anticorps endothélial spécifique (*Ulex europaeus* agglutinin 1 (UEA-1, Sigma, Lyon, France). Les expériences étaient répétées en utilisant des anticorps monoclonaux anti-desmine et anti-vimentine (Dako, Trappes, France). Les cellules positives pour Dil-Ac-LDL et UEA-1 et négatives pour la desmine et la vimentine correspondent aux cellules endothéliales et étaient utilisées entre les passages 3 et 6.

#### *3.3.2.7 Mesure de l'ET-1 dans le milieu de culture cellulaire*

Les CML d'artère pulmonaire et les CE pulmonaires étaientensemencées dans des boîtes de culture 24 puits à la densité de  $5 \times 10^4$  cellules/puit dans du milieu de culture supplémenté avec du serum de veau foetal (SVF) à 10% pendant 24h puis privées de sérum pendant 48h afin d'inhiber la croissance cellulaire. A la fin de cette période d'incubation, le surnageant était récupéré et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au dosage.

#### *3.3.2.8 Mesure de l'ET-1 immunoréactive*

Le niveau d'ET-1 était mesuré dans le milieu de culture cellulaire et dans l'homogénat de poumon à l'aide d'un kit de dosage ELISA quantitatif (R&D Systems, Minneapolis, Etats Unis) en suivant les instructions du fabricant. La densité optique à chaque longueur d'onde appropriée était mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque approprié. Les valeurs étaient exprimées en pg/mg de tissu ou  $\text{pg}/10^5$  cellules et exprimées moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

#### *3.3.2.9 Effets de l'ET-1 sur la prolifération des CML*

Les CML d'artère pulmonaire étaientensemencées dans des boîtes de culture 24 puits à la densité de  $5 \times 10^4$  cellules/puit dans du milieu de culture supplémenté avec 10% de SVF pour leur permettre d'adhérer. Les CML étaient ensuite mises en quiescence (phase G0) par

simple privation de SVF pendant 48 heures. Les cellules quiescentes étaient ensuite stimulées par du DMEM supplémenté à 0,3% de SVF contenant 1  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ]thymidine et des concentrations croissantes d'ET-1 ( $10^{-6}$  M) en l'absence et en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs ET-A et ET-B (BQ123  $10^{-7}$  M, BQ788  $10^{-7}$  M). Après 24 heures d'incubation, les cellules étaient lavées 2 fois avec du PBS à 4 °C, puis incubées en présence d'acide trichloracétique à 10% pendant 30 minutes à 4 °C afin de précipiter les acides nucléiques, et étaient enfin lysées dans du NaOH à 0,1 N (0.5 ml/puit). Le contenu de chaque puit était ensuite récupéré pour compter la radioactivité à l'aide d'un compteur  $\beta$ . Chaque condition expérimentale était réalisée 4 à 6 fois. L'incorporation de [ $^3\text{H}$ ]thymidine dans l'ADN est exprimée en coups par minute (cpm) / puits.

#### *3.3.2.10 Analyses statistiques*

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Statview<sup>®</sup>. Les résultats étaient rapportés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Une ANOVA a été utilisée pour la comparaison entre les groupes. Lorsque l'ANOVA indiquait une différence significative, les groupes étaient comparés à l'aide d'un test non paramétrique de Mann-Whitney. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée significative.

### 3.3.3 Résultats

#### 3.3.3.1 *Caractéristiques cliniques et hémodynamiques des patients*

Les caractéristiques cliniques et hémodynamiques des patients avec une HTAP sans et avec mutation de BMPR-II sont résumées dans le tableau 1. Il n'existait pas de différence entre les patients sans et avec mutation de BMPR-II pour l'âge ( $39 \pm 13$  contre  $39 \pm 8$  ans), le sexe ratio (4 femmes/6 hommes contre 5/2 respectivement), la PAPm ( $67 \pm 16$  contre  $61 \pm 10$  mmHg), les résistances pulmonaires totales indexées ( $33 \pm 9$  contre  $29 \pm 9$  UI/m<sup>2</sup>) et l'index cardiaque ( $2.1 \pm 0.5$  contre  $2.3 \pm 0.9$  L/mn/m<sup>2</sup>). Aucun de ces patients ne présentait de réponse vasodilatatrice en aigu. Enfin, tous les patients recevaient de la prostacycline, 5 et 4 patients sans et avec mutation de BMPR-II recevaient en plus du bosentan.

**Tableau 1** : caractéristiques cliniques et hémodynamiques des patients

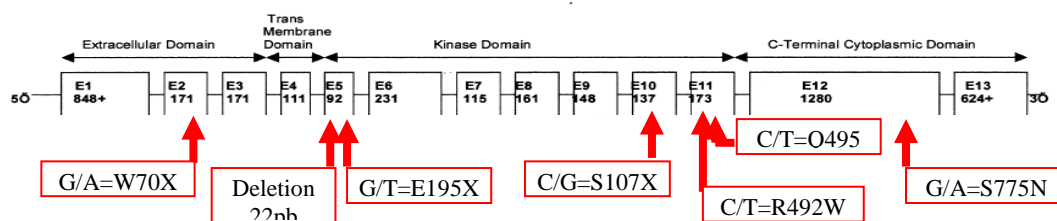
	Contrôles	HTAPi sans mutation de BMPR-II	HTAPh avec mutation de BMPR-II
Nombre	10	10	7
Age, ans	$45 \pm 3$	$32 \pm 13$	$39 \pm 8$
Sexe, F/M	5/5	4/6	5/2
PAPm, mmHg	-	$67 \pm 16$	$61 \pm 10$
IC, L/mn/m <sup>2</sup>	-	$2,1 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,9$
RPTI, UI/m <sup>2</sup>	-	$33 \pm 9$	$29 \pm 9$
Pgl <sub>2</sub> /bosentan	-	10/5	7/4

HTAPi : HTAP idiopathique ; HTAPh : HTAP héritable ; PAPm : pression artérielle pulmonaire moyenne ; IC : index cardiaque ; RPTI : résistance pulmonaire totale ; Pgl<sub>2</sub> : prostacycline intraveineuse

### 3.3.3.2 Identification et description des mutations de BMPR-II

Des mutations germinales ont été identifiées dans les 13 exons du gène codant pour BMPR-II chez les 7 patients atteints d'HTAP héritable (figure 1). Parmi les 3 exons codant pour le domaine extracellulaire de BMPR-II, une mutation hétérozygote non sens était identifiée dans l'exon 2 (W70X). Deux mutations ont été identifiées dans l'exon 5 codant pour le domaine transmembranaire de BMPR-II : une mutation hétérozygote non sens (E195X) et une autre causant une délétion de 22 paires de bases (del 22 pb). Dans les exons codant pour le domaine kinase de BMPR-II, une mutation hétérozygote faux-sens dans l'exon 10 (S107X) et l'exon 11 (R491W), une mutation non sens dans l'exon 11 (Q495X) ont été identifiées. Enfin, une mutation hétérozygote faux-sens dans l'exon 12 (S775N) qui code pour le domaine cytoplasmique de BMPR-II. Aucune mutation pour ALK-1 n'a été identifiée chez les patients avec ou sans mutation pour BMPR-II.

**Figure 1** : localisation des différentes mutations sur le gène codant pour BMPR-II



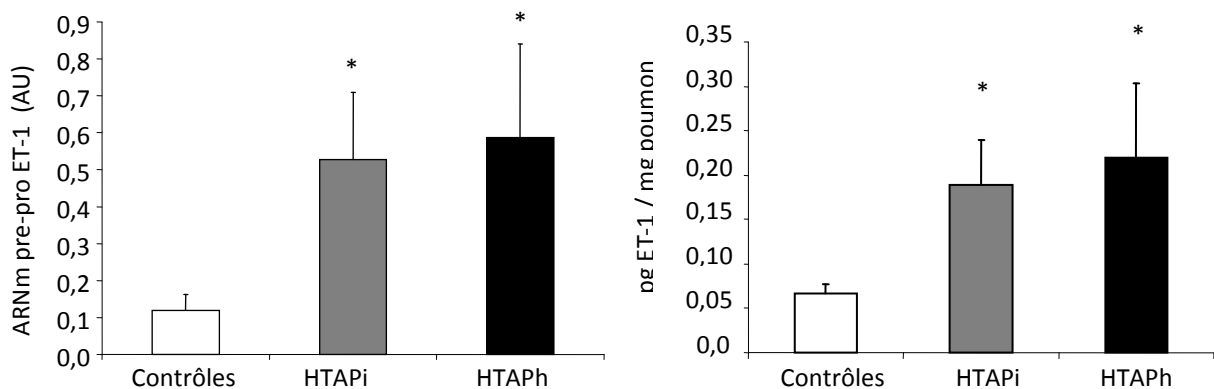
### 3.3.3.3 Expression pulmonaire de l'ARNm et de la protéine ET-1

Le niveau d'ARNm d'ET-1 dans le tissu pulmonaire était approximativement 6 fois plus élevé dans les poumons des patients avec une HTAPi sans mutation ou avec une HTAPh que chez



les contrôles (figure 2). La concentration de l'ET-1 dans l'homogénat de poumons était significativement plus élevée chez les patients avec une HTAPi sans mutation ou avec une HTAPh que chez les contrôles (figure 2). Il n'existait pas de différence entre les patients avec une HTAPi sans mutation ou avec une HTAPh.

**Figure 2 :** expression pulmonaire de l'ARNm et de la protéine ET-1 (\*  $p < 0.01$  versus contrôles).

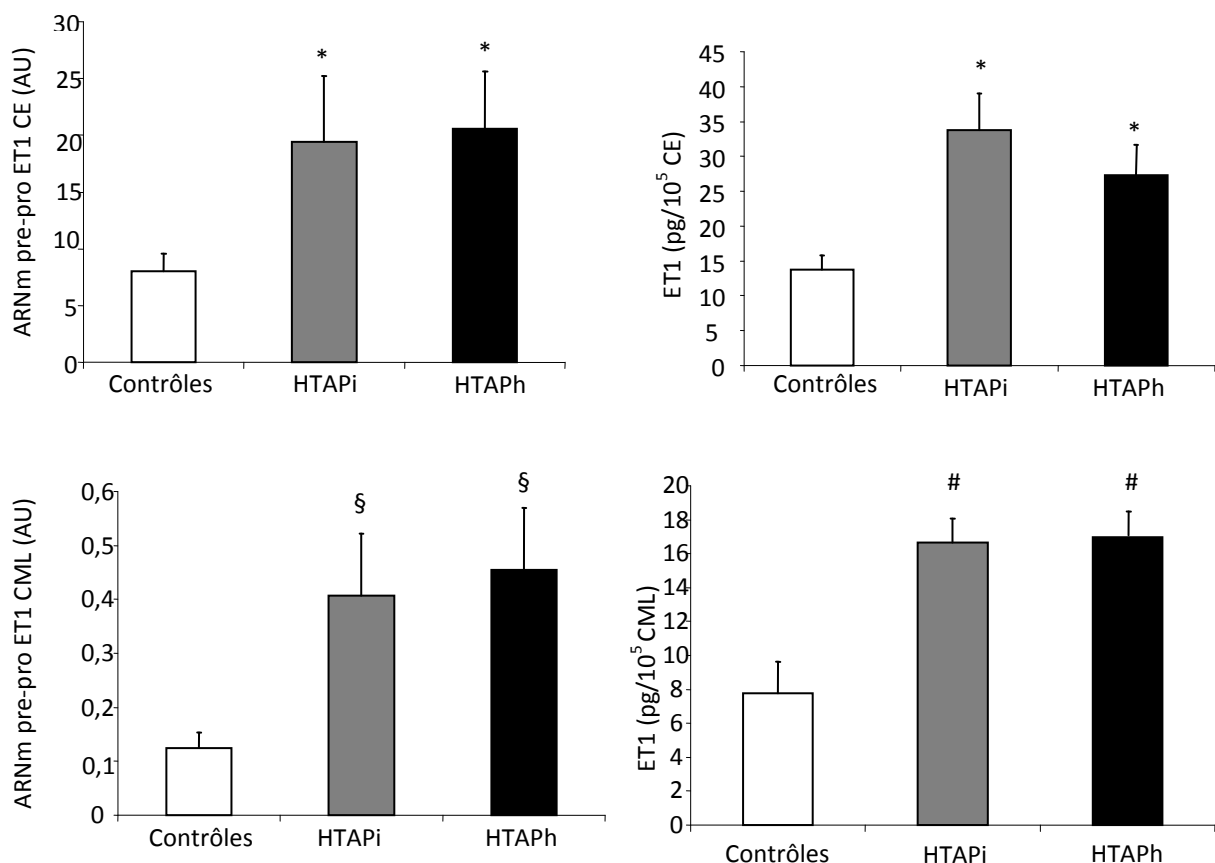


#### 3.3.3.4 Synthèse *in vitro* d'ET-1 par les CE et CML

L'évaluation du niveau de production de la protéine ET-1 dans le milieu de culture et de l'ARNm de pre-proET-1 montrait que les CE et les CML quiescentes en culture synthétisaient *in vitro* ET-1. Le niveau de production de la protéine ET-1 était environ 20 fois plus élevé dans le milieu de culture de CE que dans celui de CML de patients avec une HTAPi sans mutation ou une HTAPh avec mutation ou de contrôles. Comparativement aux sujets contrôles, le niveau d'expression de l'ARNm de pre-pro-ET-1 était significativement augmenté dans les CE et CML de patients avec une HTAPi sans mutation ou avec une HTAPh avec mutation BMPR-II (respectivement, CE :  $8.0 \pm 1.5$  unités arbitraires (UA) (contrôles) contre  $19.4 \pm 5.8$  UA (HTAPi) et  $20.5 \pm 5$  UA (HTAPh),  $p < 0.05$  ; CML :  $0.12 \pm 0.03$  UA (contrôles) contre  $0.41 \pm 0.11$  UA (HTAPi) et  $0.46 \pm 0.11$  UA (HTAPh),  $p < 0.05$ ) (figure). Comparativement aux contrôles, le niveau de production de la protéine ET-1 était significativement augmenté

dans le milieu de culture de CE et de CML de patients avec une HTAPi sans mutation et avec une HTAPh (respectivement, CE :  $138 \pm 20$  pg/ $10^5$  CE (contrôles) contre  $337 \pm 52$  pg/ $10^5$  (HTAPi) et  $273 \pm 50$  pg/ $10^5$  (HTAPh),  $p < 0.05$  ; CML :  $7.8 \pm 0.9$  pg/ $10^5$  (contrôles) contre  $16.6 \pm 1.7$  pg/ $10^5$  (HTAPi) et  $17.0 \pm 1.7$  pg/ $10^5$ ,  $p < 0.001$ ) (figure 3). Il n'existait pas de différence d'expression de l'ARNm et de la protéine ET-1 dans les CE et les CML de patients avec une HTAPi et une HTAPh.

**Figure 3 :** Expression de l'ARNm de pre-proET-1 dans les CE et CML et production de la protéine ET-1 dans le milieu de culture de CE et CML (\*  $p < 0.05$  ; §  $p < 0.01$  ; #  $p < 0.001$  versus contrôles)

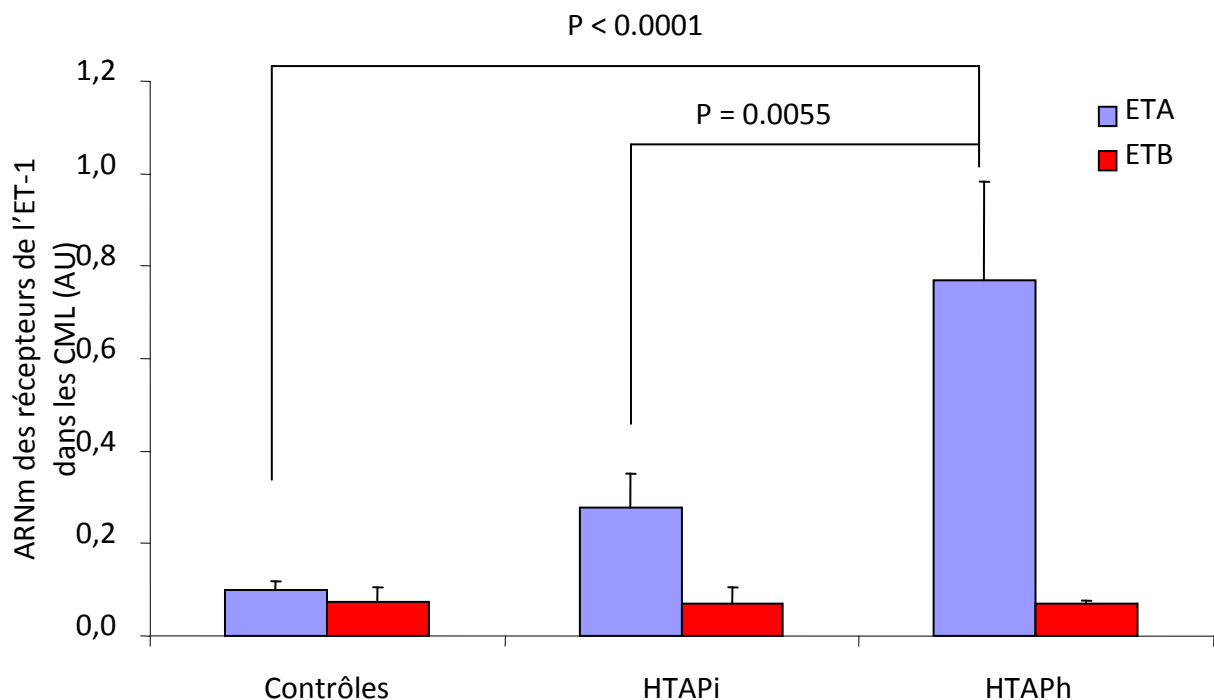


### 3.3.3.5 Expression de l'ARNm des récepteurs ET-A et ET-B dans les CML

L'expression de l'ARNm du récepteur ET-A était significativement augmentée dans les CML de patients avec une HTAPi sans mutation et HTAPh comparativement aux cellules de sujets

contrôles. Cette augmentation d'expression était significativement plus importante dans les CML de sujets avec une HTAPh comparativement aux sujets avec une HTAPi sans mutation de BMPR-II (figure 4). En revanche, aucune modification d'expression de l'ARNm du récepteur ET-B dans les CML de ces deux groupes de patients comparativement aux contrôles était mise en évidence (figure 4).

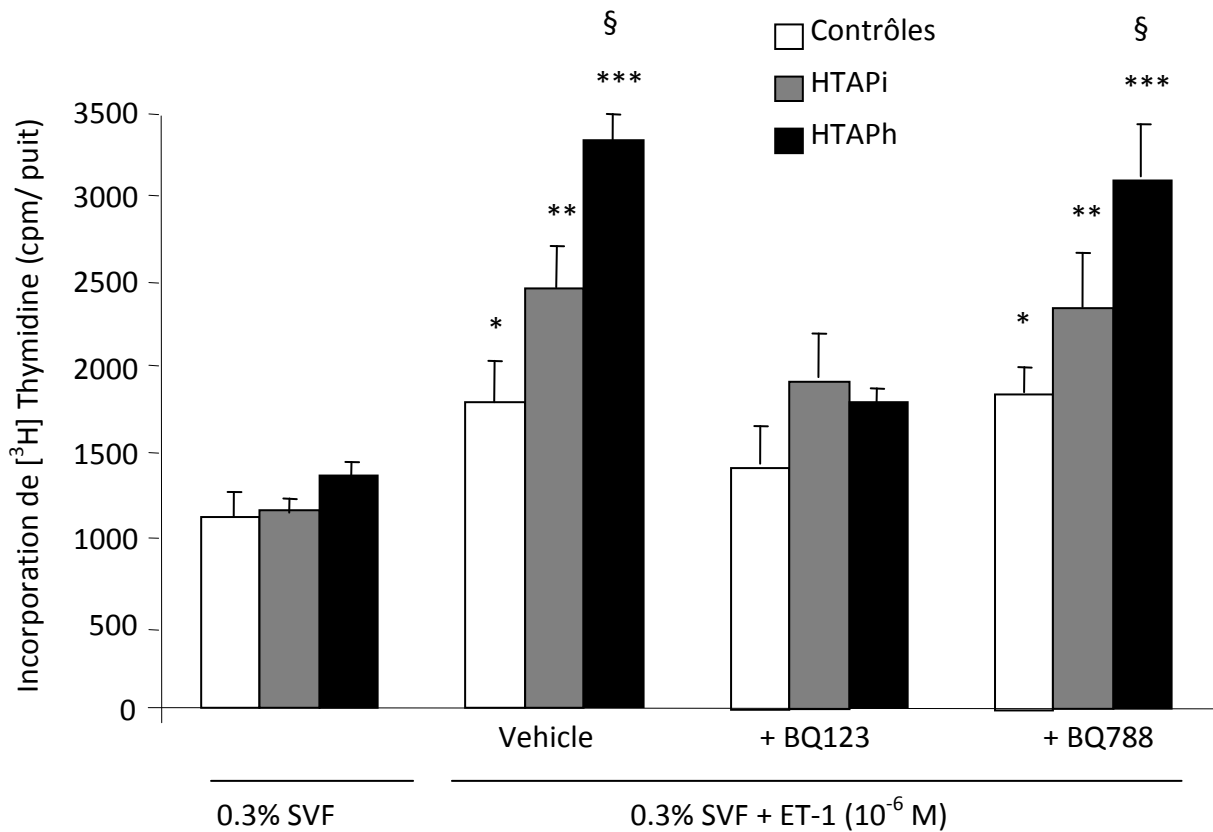
**Figure 4 :** expression de l'ARNm des récepteurs ET-A et ET-B dans les CML



### 3.3.3.6 Prolifération des CML en réponse à l'ET-1

Comparativement aux valeurs obtenues dans les conditions de base (SVF 0.3%), l'effet pro-proliférant de l'ET-1 ( $10^{-6}$ M) était modeste sur les CML de sujets contrôles, plus marqué sur les CML de sujets avec une HTAPi sans mutation et encore plus élevé sur les CML de sujets avec une HTAPh. La pré-incubation des CML avec du BQ123 ( $10^{-6}$ M), un antagoniste du récepteur ET-A, abolissait l'effet proliférant de l'ET-1. En revanche, le pré-traitement des CML par le BQ788 ( $10^{-6}$ M), un antagoniste du récepteur ET-B, ne modifiait pas la réponse pro-proliférante de l'ET-1 (figure 5).

**Figure 5 :** Effet proliférant de l'ET-1 ( $10^{-6}$ M) sur les CML sans (Vehicle) et avec antagoniste spécifique des récepteurs ET-A (BQ123  $10^{-6}$ M) et ET-B (BQ788  $10^{-6}$ M). (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$  versus 0.3% SVF ; § versus HTAPi)



### 3.3.4 Discussion

Le but de cette étude était d'évaluer la voie de l'endothéline chez des patients souffrant d'HTAP idiopathique sporadique sans mutation, d'HTAP héritable avec mutation du gène codant pour BMPR-II et des sujets contrôles.

Nous rapportons, dans la première partie de cette étude, que la synthèse d'ET-1 mesurée par l'expression de l'ARNm de pre-proET-1 et le dosage de la protéine ET-1 est significativement augmentée dans le tissu pulmonaire, les CE et les CML d'artère pulmonaire et dans leur milieu de culture de sujets avec une HTAP sans et avec mutation de BMPR-II comparativement aux contrôles. Ces résultats confirment des données déjà anciennes qui

rapportaient une augmentation du taux circulant d'ET-1 chez les patients souffrant d'HTAP (122) liée très vraisemblablement à une synthèse pulmonaire d'ET-1 accrue au cours de l'HTAP (123). Giaid et coll ont, en effet, montré que l'expression de l'ET-1 et de son ARNm était augmentée dans les poumons de sujets atteints d'HTAP (123). L'immunomarquage le plus intense était retrouvé au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire des artérioles remodelées, et de façon plus limitée, au niveau des cellules musculaires lisses de ces vaisseaux et des cellules inflammatoires (123). Plusieurs études suggèrent que la synthèse d'ET-1 au cours de l'HTAP expérimentale et humaine est stimulée par différents agents ou mécanismes parmi lesquels l'hypoxie, les forces de cisaillement, la thrombine et certaines cytokines (225, 226, 227, 228). De plus, nous observons que, *in vitro*, la synthèse d'ET-1 par les CE et, dans une moindre mesure, les CML quiescentes et non soumises à ces stimuli demeure plus importante avec les cellules de patients ayant une HTAP qu'avec les cellules de contrôles. Ceci suggère que ces hauts niveaux de synthèse d'ET-1 pourraient être liés à des anomalies constitutives des CE et des CML sous contrôle génétique. Des résultats similaires ont été publiés par notre groupe dans des études qui rapportaient une libération accrue de 5-HT dans le milieu de culture par des CE quiescentes de patients avec une HTAPi comparativement à des contrôles mais des taux similaires d'autres facteurs de croissance (PDGF-BB et EGF) (157, 215). Cette libération de 5-HT et d'ET-1 était stimulée par un pré-traitement des CE par des doses croissantes d'angiopoïétine-1 qui stimulait le récepteur Tie-2 surexprimé à la surface des CE de patients avec une HTAPi (215). De façon intéressante, l'ARNm de la tryptophane hydroxylase 1 (tph1), enzyme impliquée dans la synthèse de la 5-HT, et de l'enzyme de conversion de l'endothéline 1 (ECE1), enzyme impliquée dans le clivage de la proendothéline en endothéline étaient augmentés à l'état basal dans les CE d'HTAPi comparativement aux contrôles (215). Enfin, la présence de mutation de BMPR-II ne

semble pas modifier la synthèse d'ET-1 puisque nous trouvons des taux similaires d'ET-1 (et de son ARNm) dans le poumon, les CE et les CML de patients avec HTAP sans et avec mutation de BMPR-II. Toutefois, très récemment, il a été démontré que BMP9, un des ligands de BMPR-II, est capable de stimuler, par l'intermédiaire des smads 1/5, la libération d'ET-1 par des lignées de CE humaines (229). La voie des MAP kinases ne semblait pas impliquée (229). Or, la plupart des mutations du gène codant pour BMPR-II est à l'origine d'une altération de la signalisation impliquant les Smad alors que la voie de signalisation impliquant les MAP kinases semble conservée (137). En l'absence d'expériences de stimulation par BMP9 ou d'autres ligands de BMPR-II des CE, nous ne pouvons donc pas exclure un rôle de BMPR-II dans la synthèse d'ET-1 par les CE pulmonaires.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous rapportons que l'expression des ARNm des récepteurs ET-A dans les CML est significativement augmentée chez les patients avec une HTAPh comparativement aux patients avec une HTAPi sans mutation et aux sujets contrôles. En revanche, il n'existait aucune modification d'expression de l'ARNm du récepteur ET-B dans les CML de ces deux groupes de patients comparativement aux contrôles. Enfin, nous montrons que cette différence d'expression du récepteur ET-A dans les CML est associée à un effet pro-proliférant de l'ET-1 plus marqué sur les CML de patients avec une HTAPh comparativement aux patients avec une HTAPi sans mutation de BMPR-II et aux sujets contrôles. Une expression vasculaire accrue des récepteurs ET-A et ET-B a été rapportée dans des modèles expérimentaux d'HTA systémique et associée à une augmentation de la réponse à l'ET-1 (230, 231). D'autres études ont démontré une augmentation de l'expression des récepteurs de l'endothéline dans des modèles d'hypertension pulmonaire hypoxique (232, 233). Au cours de l'HTAP humaine, une augmentation de la densité des récepteurs ET-A a été retrouvée dans les artères pulmonaires et le parenchyme pulmonaire de patients

avec une cardiopathie congénitale (234). Enfin, Davie et coll ont démontré une importante augmentation de la densité des récepteurs ET-A et ET-B, en autoradiographie, dans les artères pulmonaires distales et le parenchyme pulmonaire de patients transplantés pour une HTAPi ou une HTAP associée à une cardiopathie congénitale (110). Dans notre étude, nous ne retrouvons pas de modification de l'expression des récepteurs ET-B dans les CML de patients avec une HTAP. Davie et coll ont clairement démontré une hétérogénéité régionale dans la distribution des récepteurs ET-A et ET-B dans les artères pulmonaires (110). En effet, la proportion des récepteurs ET-B augmente significativement entre les artères pulmonaires proximales (diamètre >8mm) où les récepteurs ET-A prédominent largement (97%) et les artères distales (diamètre 0.5 à 1mm) où les récepteurs ET-B représentent plus d'un tiers des récepteurs de l'endothéline (36%,  $p < 0.001$ ). Les CML utilisées dans notre étude proviennent d'artères pulmonaires de diamètre compris entre 5 et 10 mm ce qui pourrait donc expliquer la faible proportion de récepteurs ET-B observée dans ces cellules. L'augmentation significative de l'expression de l'ARNm des récepteurs ET-A dans les CML de patients avec une HTAPh et une mutation BMPR-II comparativement aux HTAPi sans mutation et aux contrôles est une donnée plus originale. Enfin, les CML d'HTAPh mutées prolifèrent plus après stimulation par l'ET-1 que les CML d'HTAPi non mutées et de contrôles. Il existe, à ce jour, très peu de données sur les interactions possibles entre BMPR-II et l'expression d'ET-1 et de ses récepteurs dans les cellules vasculaires. Une étude rapporte une stimulation par BMP7 de la libération d'ET-1 par des ostéoblastes et une réduction de l'expression d'ET-A dans ces cellules (235, 236). Plus récemment, Yamanaka et coll ont rapporté une augmentation de l'expression des récepteurs ETA et ETB par BMP2 et BMP7 à la surface de CML artérielles pulmonaires humaines de patients avec une HTAP (237). La présence de mutations de BMPR-II a des conséquences sur les voies de signalisation. Comparativement

aux CML d'HTAPi non mutées et aux contrôles, la présence de mutations pour BMPR-II s'accompagne : 1) d'une diminution d'expression plus marquée de l'ARNm de BMPR-II dans les CML, 2) de l'absence de phosphorylation des Smad 1/5/8 induite par BMP4 mais d'une activation par BMP4 de la voie p38 MAP kinase dans les CML, et 3) d'un phénotype prolifératif et anti-apoptotique des CML d'HTAP non inhibé par BMP4 (238). Cette altération de la voie BMPR-II/Smad joue donc un rôle important dans l'augmentation de la prolifération des CML mais nos données ne permettent pas de savoir si ces modifications sont impliquées dans l'augmentation de l'expression des récepteurs ET-A mises en évidence dans les CML mutées. Cette augmentation de l'expression des récepteurs ET-A dans les CML d'HTAP mutées et non mutées est responsable d'une augmentation de la réponse proliférative à l'ET-1. En effet, cet effet prolifératif est bloqué par la co-incubation des CML avec un antagoniste spécifique des récepteurs ET-A (BQ123) mais pas par un antagoniste sélectif des ET-B (BQ788). Ces résultats doivent être interprétés avec prudence. En effet, l'expression des récepteurs ET-B dans les CML utilisées dans cette étude est faible ce qui pourrait être lié au fait qu'elles ont été isolées à partir d'artères pulmonaires dont le diamètre était compris entre 5 et 10 mm. Les CML provenant d'artères plus distales expriment une proportion plus importante de récepteurs ET-B qui sont impliqués, au même titre que les récepteurs ET-A, dans l'effet prolifératif de l'ET-1 (110).

Notre étude présente de nombreuses limitations. Tout d'abord, contrairement à l'expression de l'ET-1, nous avons seulement étudié l'expression des ARNm des récepteurs ET-A et ET-B dans les CML. Nos résultats nécessitent une confirmation soit par hybridation *in situ*, soit en évaluant l'expression de la protéine sur des coupes de tissu pulmonaire en immunohistochimie, et/ou par Western Blot dans les CML. Enfin, les mécanismes responsables de cette augmentation d'expression des récepteurs ET-A dans les CML mutées



n'ont pas été évalués dans cette étude et nécessiteraient des études *in vitro* complémentaires en évaluant, notamment, les conséquences d'une stimulation des CML par BMP4 et/ou BMP7 sur l'expression des récepteurs ET-A et ET-B.

En conclusion, les résultats de cette étude suggèrent que la présence de mutation de BMPRII n'affecte pas la synthèse d'ET-1 mais pourrait modifier l'expression des récepteurs ET-A et la réponse proliférative des CML à l'ET-1.

## 4 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce mémoire de Thèse explorent différents aspects de la physiopathologie de l'HTAP impliquant des facteurs vaso-actifs et inflammatoires. Les connaissances sur la physiopathologie de l'HTAP ont énormément progressé ces dernières années. Initialement, le concept classique de vasoconstriction chronique de la circulation pulmonaire à l'origine du remodelage vasculaire pulmonaire était principalement soutenu par des études chez le rat exposé à une hypoxie prolongée ou traité par la monocrotaline (239, 240). Toutefois, au cours de l'HTAP humaine, la composante vasoconstrictrice ne semble pas prédominante (du moins, au moment du diagnostic) car seule une minorité de patients (5 à 10%), principalement atteints de la forme sporadique idiopathique, présente une réponse vasodilatatrice en aigu et peuvent être traités très efficacement par des traitements vasodilatateurs purs comme les inhibiteurs calciques (241, 242). De fait, la majorité des patients atteints d'HTAP ne présente pas de réponse vasodilatatrice en aigu et l'analyse anatomo-pathologique des lésions vasculaires effectuées, le plus souvent, à un stade très évolué de la maladie lors d'autopsie ou à l'occasion de transplantation pulmonaire met en évidence un intense remodelage de la microcirculation pulmonaire associant non seulement une hypertrophie de la media mais également des lésions vasculaires complexes et obstructives des artérioles pulmonaires résistives (59). La mise en évidence, au sein de ces lésions, d'une prolifération clonale de cellules endothéliales (185) et de mutations somatiques dans les cellules endothéliales (63) a fourni des arguments en faveur du concept de vasculopathie proliférative caractérisée par une prolifération inexplicée des CML et des CE artérielles pulmonaires. Les résultats d'études récentes suggèrent, en effet, que les mécanismes prolifératifs des cellules constituant la paroi vasculaire seraient proches de ceux

observés dans la prolifération tumorale (243-245). Bien que les mécanismes moléculaires, biochimiques et cellulaires caractérisant la cellule tumorale soient très complexes et différents d'un cancer à l'autre, des caractéristiques communes ont été décrites (246). Six anomalies essentielles affectant la physiologie cellulaire ont récemment été proposées comme caractéristiques des cellules cancéreuses (246). Elles incluent : 1) l'autosuffisance en facteurs de croissance, 2) l'insensibilité aux signaux inhibant la croissance, 3) l'échappement au programme de mort cellulaire (apoptose), 4) l'angiogenèse soutenue, 5) le potentiel répliatif illimité, et 6) l'invasion tissulaire (métastase) (246). Certaines de ces caractéristiques pourraient être partagées par les cellules vasculaires pulmonaires impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP.

#### ***L'autosuffisance en facteurs de croissance***

Les cellules normales requièrent des signaux de croissance afin de passer d'un état quiescent à un état de prolifération active. A l'inverse, les cellules tumorales présentent un état de dépendance réduit vis-à-vis des stimuli mitotiques exogènes car elles sont capables de synthétiser elles-mêmes leurs propres facteurs de croissance. Au cours de l'HTAP, les CML de patients avec une HTAP et cultivées en dehors de leur environnement physiologique *in vivo* nécessitent d'être cultivées dans un milieu contenant des facteurs de croissance pour proliférer. Nous montrons, dans les études présentées dans ce mémoire, qu'elles présentent également une prolifération plus importante lorsqu'elles sont stimulées par certains facteurs comme la sérotonine (5-HT), l'endothéline (ET-1) ou CCL-2. En revanche, elles prolifèrent autant que des CML de contrôles en réponse à d'autres facteurs de croissance tels PDGF, EGF, FGF, IGF ou TGF $\beta$ . Nous montrons également qu'il existe une expression accrue, à la surface des CML d'HTAP, du transporteur de la sérotonine (5-HTT), des récepteurs ET-A, et des récepteurs CCR-2 qui médient respectivement l'effet prolifératif de 5-HT, ET-1 et CCL-2 ;

ce qui explique probablement cette réponse proliférative excessive à ces agents. Ainsi, une anomalie commune aux cellules tumorales et CML d'HTAP est une augmentation d'expression des récepteurs à la surface de ces cellules capables de transduire le signal de croissance en réponse aux facteurs de croissance.

Ces altérations ne sont pas les seuls mécanismes conduisant à une prolifération excessive des CML d'HTAP. Les cellules tumorales sont également capables de produire des facteurs de croissance auxquels elles sont sensibles, créant ainsi une boucle de régulation positive (246). Une stimulation autocrine est également mise en évidence dans les CML d'HTAP mais seulement à un niveau probablement trop faible pour induire, par lui-même, leur prolifération. Cependant, même à faible taux, ces facteurs autocrines peuvent agir en synergie avec les facteurs de croissance exogènes pour augmenter le taux de croissance des CML. Par ailleurs, nous montrons de façon intéressante que les CML d'HTAP en culture libèrent des taux plus importants d'ET-1 et de CCL-2 que les CML de contrôles. Les anomalies précédemment décrites sont mises en évidence dans les CML en culture c'est-à-dire en dehors de leur environnement physiologique pulmonaire.

Des altérations supplémentaires sont présentes *in vivo* et ne persistent pas *in vitro* et peuvent contribuer au potentiel prolifératif des CML au sein de la paroi des artérioles pulmonaires. Ainsi, les CML d'HTAP possèdent une réponse proliférative au PDGF exogène comparable à celle observée avec des CML de contrôle (168) bien qu'une expression accrue du récepteur phosphorylé au PDGF soit mise en évidence dans le tissu pulmonaire de patients souffrant d'HTAP idiopathique (72, 209). Par ailleurs, l'imatinib, un inhibiteur des tyrosine kinases, inhibant la kinase Bcr-Abl, le récepteur des cellules souches c-kit et le récepteur au PDGF, est capable de faire régresser l'HTAP expérimentale et est actuellement en cours d'évaluation dans l'HTAP humaine (72, 209, 212). Les interactions entre les CML et

les autres cellules de la paroi vasculaire, les CE et les fibroblastes, peuvent également jouer un rôle clé *in vivo* dans la stimulation de la prolifération des CML. Les CE pulmonaires pourraient être impliquées dans le processus de remodelage vasculaire pulmonaire non seulement pour leur capacité à réguler physiologiquement le tonus vasculaire mais également dans la synthèse et la libération de facteurs de croissance (247). Ainsi, les CE d'HTAP synthétisent et libèrent des quantités significativement plus importantes de 5-HT (157) mais également, ainsi que nous le rapportons, d'ET-1 et de CCL-2 que les CE de contrôles. Ces agents agissent en stimulant la prolifération des CML probablement par un mécanisme paracrine. Ce véritable dialogue entre CML et CE *in vivo* a pu être reproduit dans des expériences *in vitro* (157, 248). Au cours de ces expériences, l'incubation des CML avec du milieu de culture de CE induit une prolifération des CML. Cet effet prolifératif est augmenté lorsque le milieu de culture provient de CE d'HTAP (157, 248).

De plus, nous montrons que les CE d'HTAP sont également capables de recruter des cellules inflammatoires au sein des artérioles remodelées en sécrétant des chimiokines qui pourraient également contribuer à la prolifération des CML. L'implication des leucocytes (macrophages, lymphocytes) dans les lésions plexiformes a été initialement décrite par Tudor et coll (185) et confirmée dans d'autres études (183, 184). Plusieurs études ont démontré le rôle des chimiokines dans le recrutement des cellules inflammatoires dans le poumon de patients souffrant d'HTAP (193, 199). Une autre étude a attiré l'attention sur le fait que les chimiokines produites dans la microcirculation des patients atteints d'HTAP contribuait non seulement au recrutement de cellules inflammatoires mais également à la prolifération des CML (194). Nous avons élargi cette observation à CCL2 qui est impliquée dans l'activation et la migration des monocytes/macrophages. Nous montrons que les CE et CML d'HTAP en culture libèrent des niveaux de CCL2 plus importants que les cellules

normales et que la migration de monocytes est significativement augmentée en présence de CE et que cet effet est encore plus marqué en présence de CE d'HTAP. Cet effet était en grande partie bloqué en présence d'anticorps antiCCL2. Ainsi, l'interaction leucocytes/endothélium, impliquant RANTES, fractalkine et CCL2, pourrait être responsable d'une accumulation leucocytaire périvasculaire sélective telle qu'elle peut s'observer dans l'HTAP. Cette composante inflammatoire dans la physiopathologie de l'HTAP peut représenter une cible thérapeutique intéressante dans certaines formes d'HTAP compliquant certaines connectivites (20, 21).

### ***L'insensibilité aux signaux inhibant la croissance***

L'une des caractéristiques des cellules tumorales est leur résistance aux signaux inhibant la prolifération qui maintiennent normalement la cellule dans un état quiescent et l'homéostasie tissulaire. Au cours de l'HTAP, il existe une expression réduite et/ou une anomalie de fonction du récepteur de type II du TGF $\beta$  : BMPR-II (135). Des mutations germinales dans le gène codant pour BMPR-II, ont été identifiées chez près de 70% des cas d'HTAP familiales et 10 à 30% des cas d'HTAP idiopathiques ou associées à la prise d'anorexigènes (9, 129). L'expression vasculaire pulmonaire de BMPR-II est très diminuée au cours de l'HTAP (139), notamment au niveau des CML artérielles pulmonaires conduisant à une sensibilité diminuée de ces cellules à l'inhibition de croissance par les ligands spécifiques de BMPR-II tels BMP2, BMP4, BMP6 et BMP7 comparativement aux cellules normales (238). Les CML de patients avec une HTAP sans mutation expriment un niveau d'expression de BMPR-II aussi bas que des CML mutées et sont aussi résistantes à l'inhibition de la prolifération induite par les BMP (238). L'origine de ces anomalies demeure largement mal comprise mais représentent des caractéristiques essentielles des HTAP mutées et non mutées (135). Dans la troisième étude présentée dans ce mémoire, nous nous sommes

intéressés aux interactions possibles des mutations de BMPR-II sur la voie de l'ET-1. Nos résultats montrent que l'expression vasculaire pulmonaire d'ET-1 n'est pas affectée au cours de l'HTAP avec et sans mutation de BMPR-II. En revanche, nos résultats suggèrent que l'expression des récepteurs ET-A pourrait être augmentée dans les CML d'HTAP mutées pour BMPR-II comparativement aux CML non mutées et normales, et que la réponse proliférative des CML à l'ET1 est augmentée pour les CML mutées et est bloquée par un antagoniste spécifique d'ET-A. L'implication thérapeutique potentielle de ces résultats suggère que les antagonistes sélectifs des récepteurs ET-A (ambrisentan, sitaxentan) pourraient être plus efficaces que les antagonistes non sélectifs (bosentan) chez les patients souffrant d'HTAP et présentant une mutation de BMPR-II. Ces patients sont désormais regroupés sous le terme d'HTAP héritable (1) et semblent présenter une forme peut-être plus agressive d'HTAP caractérisée par des critères hémodynamiques plus sévères lors du diagnostic et une proportion plus faible de patients répondeurs aux vasodilatateurs en aigu (10-12). Toutefois, la survie globale est similaire entre les patients mutés et non mutés (12). Il n'est pas rapporté, dans les essais cliniques et la pratique quotidienne, de différence de réponse aux différentes thérapeutiques et notamment aux antagonistes des récepteurs de l'endothéline mais cette question spécifique n'a pas été soulevée et une analyse *post-hoc* des différents essais randomisés ayant évalué cette classe thérapeutique pourrait donner quelques éléments de réponse.

### ***L'échappement au programme de mort cellulaire (apoptose)***

Dans les organismes adultes, l'apoptose maintient l'homéostasie des tissus différenciés en régulant la balance entre la prolifération et la mort cellulaires. La capacité des cellules tumorales à se développer est déterminée non seulement par une augmentation de la prolifération cellulaire mais également par une résistance à la mort cellulaire. La résistance

des cellules tumorales à la mort cellulaire représente une caractéristique importante des cellules tumorales. Au cours de l'HTAP, des signaux anti-apoptotiques et des facteurs de croissance agissent de concert pour produire la prolifération des CML. Le transfert pulmonaire d'un gène exprimant la protéine inhibant l'apoptose, survivine, est capable de déclencher un remodelage vasculaire pulmonaire et une HTAP chez le rat (70). Ces résultats indiquent que la régulation de la balance entre les activités mitotiques et apoptotiques dans la circulation pulmonaire normale est indispensable pour maintenir l'intégrité vasculaire pulmonaire. Le transfert du gène de la survivine à des CML en culture n'induit pas de prolifération cellulaire suggérant que des facteurs de croissance sont continuellement délivrés *in vivo* aux vaisseaux pulmonaires normaux. D'autres études montrent que les CML d'HTAP sont résistantes à l'apoptose induite par BMP2, BMP7 ou la staurosporine (137). Ces molécules activant la voie intrinsèque de l'apoptose, ces données suggèrent que les CML d'HTAP sont résistantes aux stimuli de l'apoptose agissant sur cette voie. Des études sont nécessaires afin de mieux identifier les signaux moléculaires qui deviennent anormaux dans l'HTAP et pour déterminer s'ils pourraient représenter des cibles thérapeutiques potentielles. L'induction de l'apoptose des CML pourrait, en effet, représenter une nouvelle option thérapeutique. Des études récentes suggèrent que le dichloroacetate, un inhibiteur de la pyruvate dehydrogenase kinase, est capable d'induire l'apoptose des CML et de faire régresser l'HTAP dans des modèles expérimentaux d'HTAP (249, 250).

Contrairement aux effets observés sur les CML, les anomalies de la voie de BMPR-II favorisent l'apoptose des CE vasculaires pulmonaires (143). La stimulation des CE d'HTAP par BMP2 et BMP7 réduit significativement l'apoptose de ces cellules induite par une privation de sérum (143). De plus, l'inhibition de BMPR-II par la transfection des CE avec un *small interfering RNA* (siRNA) pour BMPR-II augmente la susceptibilité des CE à l'apoptose (143).



Ces effets contraires des BMP sur les CE et les CML conduit à formuler une hypothèse sur la genèse du dommage vasculaire et du remodelage vasculaire pulmonaire au cours de l'HTAP. Une réduction importante de l'expression et de la fonction de BMPR-II au niveau endothélial pourrait favoriser l'apoptose des CE altérant de manière l'intégrité de la barrière endothéliale et permettrait l'action de facteurs de croissance sériques et d'élastase. De plus, ce haut taux d'apoptose endothéliale pourrait favoriser l'émergence de clones de CE résistantes à l'apoptose et conduire à la formation des lésions plexiformes. Les CML sous-jacentes qui présentent une résistance à l'apoptose induite par les BMP sont soumises à l'action de facteurs de croissance qui stimulent leur prolifération (144).

### ***L'angiogenèse soutenue***

L'angiogenèse est un pré-requis incontournable pour le développement tumoral et les différentes molécules anti-angiogéniques ont un réel effet anti-tumoral et font désormais partie de l'arsenal thérapeutique de beaucoup de cancers (251). Dans l'HTAP, l'expression du VEGF est accrue dans les vaisseaux pulmonaires y compris au sein des lésions plexiformes (61, 204). De plus, des études ont rapporté un contenu plaquettaire en VEGF accru chez les patients souffrant d'HTAP (252). Ainsi, une surexpression de facteurs angiogéniques semble être associée à la progression de l'HTAP, probablement par le développement de néo-vaisseaux au sein des artérioles pulmonaires remodelées.

## 5 CONCLUSION

En conclusion, il existe de nombreuses analogies entre les cellules tumorales et les cellules vasculaires pulmonaires au cours de l'HTAP. Plusieurs voies de signalisation peuvent conduire les cellules vasculaires à présenter un phénotype « tumoral » et les séquences conduisant les CML et les CE à ce phénotype demeurent inconnues. Nos travaux révèlent que des facteurs vaso-actifs (ET-1, 5-HT) et inflammatoires jouent un rôle déterminant dans la physiopathologie de l'HTAP. Les thérapeutiques actuelles de l'HTAP visent à corriger la dysfonction endothéliale. Elles ont permis d'obtenir une importante amélioration mais l'HTAP demeure une maladie incurable et une meilleure compréhension des phénomènes à l'origine de ce phénotype « tumoral » des CE et CML pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

## 6 REFERENCES

1. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S43-54.
2. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1023-30.
3. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective study. *Ann Intern Med*. 1991;115:343-9.
4. Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M. Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med*. 1954;30:195-207.
5. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737-44.
6. Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000;26:81-4.
7. Trembath RC. Mutations in the TGF-beta type 1 receptor, ALK1, in combined primary pulmonary hypertension and hereditary haemorrhagic telangiectasia, implies pathway specificity. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:175.
8. Chaouat A, Coulet F, Favre C, et al. Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2004;59:446-8.
9. Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S32-42.
10. Elliott CG, Glissmeyer EW, Havlena GT, et al. Relationship of BMPR2 mutations to vasoreactivity in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006;113:2509-15.
11. Rosenzweig EB, Morse JH, Knowles JA, et al. Clinical implications of determining BMPR2 mutation status in a large cohort of children and adults with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:668-74.

12. Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMP2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1377-83.
13. Gurtner HP. Pulmonary hypertension, "plexogenic pulmonary arteriopathy" and the appetite depressant drug aminorex: post or propter? *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1979;15:897-923.
14. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, et al. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.* 1996;335:609-16.
15. Rich S, Rubin L, Walker AM, et al. Anorexigens and pulmonary hypertension in the United States: results from the surveillance of North American pulmonary hypertension. *Chest.* 2000;117:870-4.
16. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3792-800.
17. Mukerjee D, St George D, Coleiro B, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis.* 2003;62:1088-93.
18. Sanchez O, Sitbon O, Garcia G, et al. [Pulmonary artery hypertension associated with connective tissue diseases]. *Presse Med.* 2003;32:789-99.
19. Humbert M, Sanchez O, Fartoukh M, et al. Short-term and long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy in pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases: results of a pilot study. *Eur Respir J.* 1999;13:1351-6.
20. Jais X, Launay D, Yaici A, et al. Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis of twenty-three cases. *Arthritis Rheum.* 2008;58:521-31.
21. Sanchez O, Sitbon O, Jais X, et al. Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2006;130:182-9.
22. Hoffman JI, Rudolph AM. The natural history of ventricular septal defects in infancy. *Am J Cardiol.* 1965;16:634-53.
23. Vogel M, Berger F, Kramer A, et al. Incidence of secondary pulmonary hypertension in adults with atrial septal or sinus venosus defects. *Heart.* 1999;82:30-3.

24. Kidd L, Driscoll DJ, Gersony WM, et al. Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with ventricular septal defects. *Circulation*. 1993;87:138-51.
25. Vongpatanasin W, Brickner ME, Hillis LD, et al. The Eisenmenger syndrome in adults. *Ann Intern Med*. 1998;128:745-55.
26. Aessopos A, Stamatelos G, Skoumas V, et al. Pulmonary hypertension and right heart failure in patients with beta-thalassemia intermedia. *Chest*. 1995;107:50-3.
27. Hoepfer MM, Krowka MJ, Strassburg CP. Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome. *Lancet*. 2004;363:1461-8.
28. Hadengue A, Benhayoun MK, Lebrec D, et al. Pulmonary hypertension complicating portal hypertension: prevalence and relation to splanchnic hemodynamics. *Gastroenterology*. 1991;100:520-8.
29. Castro M, Krowka MJ, Schroeder DR, et al. Frequency and clinical implications of increased pulmonary artery pressures in liver transplant patients. *Mayo Clin Proc*. 1996;71:543-51.
30. Krowka MJ, Mandell MS, Ramsay MA, et al. Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: a report of the multicenter liver transplant database. *Liver Transpl*. 2004;10:174-82.
31. Le Pavec J, Souza R, Herve P, et al. Portopulmonary hypertension: survival and prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:637-43.
32. Krowka MJ, Edwards WD. A spectrum of pulmonary vascular pathology in portopulmonary hypertension. *Liver Transpl*. 2000;6:241-2.
33. Kim KK, Factor SM. Membranoproliferative glomerulonephritis and plexogenic pulmonary arteriopathy in a homosexual man with acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol*. 1987;18:1293-6.
34. Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, et al. HIV-Related pulmonary hypertension: analytic review of 131 cases. *Chest*. 2000;118:1133-41.
35. Speich R, Jenni R, Opravil M, et al. Primary pulmonary hypertension in HIV infection. *Chest*. 1991;100:1268-71.
36. Sitbon O, Lascoux-Combe C, Delfraissy JF, et al. Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:108-13.

37. Nunes H, Humbert M, Sitbon O, et al. Prognostic factors for survival in human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:1433-9.
38. Degano B, Yaici A, Le Pavec J, et al. Long-term effects of bosentan in patients with HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2009;33:92-8.
39. Sitbon O, Gressin V, Speich R, et al. Bosentan for the treatment of human immunodeficiency virus-associated pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:1212-7.
40. Lapa M, Dias B, Jardim C, et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation.* 2009;119:1518-23.
41. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2004;350:886-95.
42. Montani D, Achouh L, Dorfmuller P, et al. Pulmonary veno-occlusive disease: clinical, functional, radiologic, and hemodynamic characteristics and outcome of 24 cases confirmed by histology. *Medicine (Baltimore).* 2008;87:220-33.
43. Montani D, Price LC, Dorfmuller P, et al. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2009;33:189-200.
44. Humbert M, Maitre S, Capron F, et al. Pulmonary edema complicating continuous intravenous prostacyclin in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1681-5.
45. Resten A, Maitre S, Humbert M, et al. Pulmonary hypertension: CT of the chest in pulmonary venoocclusive disease. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;183:65-70.
46. Rabiller A, Jais X, Hamid A, et al. Occult alveolar haemorrhage in pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2006;27:108-13.
47. Costard-Jackle A, Fowler MB. Influence of preoperative pulmonary artery pressure on mortality after heart transplantation: testing of potential reversibility of pulmonary hypertension with nitroprusside is useful in defining a high risk group. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:48-54.
48. Oudiz RJ. Pulmonary hypertension associated with left-sided heart disease. *Clin Chest Med.* 2007;28:233-41, x.
49. Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, et al. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:189-94.

50. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, et al. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:5S-12S.
51. Moser KM, Bloor CM. Pulmonary vascular lesions occurring in patients with chronic major vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Chest*. 1993;103:685-92.
52. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 1990;81:1735-43.
53. Pengo V, Lensing AW, Prins MH, et al. Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism. *N Engl J Med*. 2004;350:2257-64.
54. Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2004;23:637-48.
55. Jais X, D'Armini AM, Jansa P, et al. Bosentan for treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: BENEFIT (Bosentan Effects in iNoperable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension), a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2127-34.
56. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, et al. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol*. 1997;28:434-42.
57. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Primary pulmonary hypertension : a pathological study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation*. 1970;42:1163-84.
58. Bjornsson J, Edwards WD. Primary pulmonary hypertension: a histopathological study of 80 cases. *Mayo Clin Proc*. 1985;60:16-25.
59. Pietra GG, Capron F, Stewart S, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:25S-32S.
60. Mandegar M, Fung YC, Huang W, et al. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*. 2004;68:75-103.
61. Tudor RM, Chacon M, Alger L, et al. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol*. 2001;195:367-74.
62. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, et al. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 1998;101:927-34.

63. Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, et al. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2001;88:E2-E11.
64. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004;109:159-65.
65. Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, et al. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res.* 1997;81:940-52.
66. Wharton J, Davie N, Upton PD, et al. Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102:3130-6.
67. McMurtry MS, Moudgil R, Hashimoto K, et al. Overexpression of human bone morphogenetic protein receptor 2 does not ameliorate monocrotaline pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L872-8.
68. Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation.* 2001;104:790-5.
69. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, et al. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *Faseb J.* 2005;19:1178-80.
70. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005;115:1479-91.
71. Guignabert C, Izikki M, Tu LI, et al. Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2006;98:1323-30.
72. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:81-8.
73. Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, et al. Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1998;98:1400-6.



74. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, et al. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 1998;351:726-7.
75. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*. 2006;99:675-91.
76. Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J Clin Invest*. 2000;105:21-34.
77. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, et al. Primary pulmonary hypertension: Natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984;70:580-7.
78. Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, et al. Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the national heart, heart, lung, and blood institute, primary pulmonary hypertension registry. *Circulation*. 1989;80:1198-206.
79. Johnson SR, Granton JT, Mehta S. Thrombotic Arteriopathy and Anticoagulation in Pulmonary Hypertension. *Chest*. 2006;130:545-52.
80. Eisenberg PR, Lucore C, Kaufman L, et al. Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1990;82:841-7.
81. Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, et al. Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest*. 1996;110:710-7.
82. Geggel RL, Carvalho AC, Hoyer LW, et al. von Willebrand factor abnormalities in primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis*. 1987;135:294-9.
83. Galie N, Manes A, Negro L, et al. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2009;30:394-403.
84. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327:70-5.
85. Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1925-32.

86. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334:296-302.
87. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, et al. Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil, a Prostacyclin Analogue, in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:800-4.
88. Langleben D, Christman BW, Barst RJ, et al. Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am Heart J.* 2002;143:E4.
89. Murad F. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 2006;355:2003-11.
90. Griffiths MJ, Evans TW. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med.* 2005;353:2683-95.
91. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003;93:96-105.
92. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, et al. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:755-68.
93. Dinh-Xuan AT. Endothelial modulation of pulmonary vascular tone. *Eur Respir J.* 1992;5:757-62.
94. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1995;333:214-21.
95. Archer SL, Djaballah K, Humbert M, et al. Nitric oxide deficiency in fenfluramine- and dexfenfluramine-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1061-7.
96. Wharton J, Strange JW, Moller GM, et al. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:105-13.
97. Nagendran J, Archer SL, Soliman D, et al. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation.* 2007;116:238-48.

98. Pullamsetti S, Kiss L, Ghofrani HA, et al. Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. *Faseb J*. 2005;19:1175-7.
99. Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, et al. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation*. 2007;115:2331-9.
100. Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, et al. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2009;119:2894-903.
101. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005;353:2148-57.
102. Schermuly RT, Stasch JP, Pullamsetti SS, et al. Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2008;32:881-91.
103. Grimminger F, Weimann G, Frey R, et al. First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009;33:785-92.
104. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-5.
105. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356-63.
106. Sirvio ML, Metsarinne K, Saijonmaa O, et al. Tissue distribution and half-life of 125I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;167:1191-5.
107. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, et al. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*. 1990;81:1415-8.
108. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, et al. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*. 1996;94:1578-84.
109. Masaki T, Miwa S, Sawamura T, et al. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol*. 1999;375:133-8.
110. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, et al. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:398-405.

111. Bonvallet ST, Oka M, Yano M, et al. BQ123, an ETA receptor antagonist, attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in rat pulmonary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22:39-43.
112. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation.* 1995;92:357-63.
113. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, et al. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation.* 1994;89:1203-8.
114. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, et al. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;91:1367-73.
115. Shichiri M, Kato H, Marumo F, et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension.* 1997;30:1198-203.
116. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol.* 1996;81:1510-5.
117. Eddahibi S, Springall D, Mannan M, et al. Dilator effect of endothelins in pulmonary circulation: changes associated with chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1993;265:L571-80.
118. Clerk A, Kemp TJ, Harrison JG, et al. Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem J.* 2002;368:101-10.
119. Zamora MA, Dempsey EC, Walchak SJ, et al. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9:429-33.
120. Aramori I, Nakanishi S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1992;267:12468-74.
121. Simonson MS, Dunn MJ. The molecular mechanisms of cardiovascular and renal regulation by endothelin peptides. *J Lab Clin Med.* 1992;119:622-39.
122. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* 1991;114:464-9.
123. Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, et al. Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet.* 1993;341:1550-4.

124. Rubens C, Ewert R, Halank M, et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001;120:1562-9.
125. Barst RJ, Langleben D, Frost A, et al. Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:441-7.
126. Galie N, Badesch D, Oudiz R, et al. Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:529-35.
127. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2002;346:896-903.
128. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685-700.
129. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet*. 2000;37:741-5.
130. Machado RD, Aldred MA, James V, et al. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2006;27:121-32.
131. Govani FS, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:860-71.
132. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003;40:865-71.
133. Massague J. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev*. 2003;17:2993-7.
134. Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal*. 2004;16:291-9.
135. Morrell NW. Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling? *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:680-6.
136. Rudarakanchana N, Flanagan JA, Chen H, et al. Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1517-25.

137. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285:L740-54.
138. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 2002;296:1646-7.
139. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation.* 2002;105:1672-8.
140. Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2005;96:1053-63.
141. Yang J, Davies RJ, Southwood M, et al. Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells: implications for familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2008;102:1212-21.
142. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, et al. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation.* 2002;106:2263-70.
143. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, et al. 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;98:209-17.
144. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, et al. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:S20-31.
145. Rondelet B, Kerbaul F, Van Beneden R, et al. Signaling Molecules in Overcirculation-Induced Pulmonary Hypertension in Piglets. Effects of Sildenafil Therapy. *Circulation.* 2004.
146. Takahashi H, Goto N, Kojima Y, et al. Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290:L450-8.
147. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, et al. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenetic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res.* 2009;104:1184-91.

148. Hong KH, Lee YJ, Lee E, et al. Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008;118:722-30.
149. Young KA, Ivester C, West J, et al. BMP signaling controls PASMC KV channel expression in vitro and in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L841-8.
150. Reynolds AM, Xia W, Holmes MD, et al. Bone morphogenetic protein type 2 receptor gene therapy attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292:L1182-92.
151. Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, et al. BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol*. 2000;221:249-58.
152. Long L, MacLean MR, Jeffery TK, et al. Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res*. 2006;98:818-27.
153. Song Y, Jones JE, Beppu H, et al. Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation*. 2005;112:553-62.
154. Darmon MC, Guibert B, Leviel V, et al. Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J Neurochem*. 1988;51:312-6.
155. Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:1673-80.
156. Cote F, Thevenot E, Fligny C, et al. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13525-30.
157. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, et al. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*. 2006;113:1857-64.
158. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995;99:249-54.
159. Fanburg BL, Lee SL. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am J Physiol* 272 (Lung cell mol physiol 16). 1997;272:L795-L806.
160. MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, et al. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*. 2000;131:161-8.

161. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells-Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res.* 1999;84:329-36.
162. Lee SL, Wang WW, Moore BJ, et al. Dual effect of serotonin on growth of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *CircRes.* 1991;68:1362-8.
163. Eddahibi S, Adnot S. Anorexigen-induced pulmonary hypertension and the serotonin (5-HT) hypothesis: lessons for the future in pathogenesis. *Respir Res.* 2002;3:9.
164. Rothman RB, Ayestas MA, Dersch CM, et al. Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 1999;100:869-75.
165. Eddahibi S, Hanoun N, Lanfumey L, et al. Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest.* 2000;105:1555-62.
166. Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, et al. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation.* 2005;111:2812-9.
167. MacLean MR, Deuchar GA, Hicks MN, et al. Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2004;109:2150-5.
168. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2001;108:1141-50.
169. Lesch K-P, Bengel D, Heils A, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996;274:1527-31.
170. Marcos E, Fadel E, Sanchez O, et al. Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2004;94:1263-70.
171. Machado RD, Koehler R, Glissmeyer E, et al. Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:793-7.
172. Willers ED, Newman JH, Loyd JE, et al. Serotonin transporter polymorphisms in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:798-802.



173. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2003;22:358-63.
174. Launay D, Hachulla E, Hatron PY, et al. Pulmonary arterial hypertension: a rare complication of primary Sjogren syndrome: report of 9 new cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2007;86:299-315.
175. Launay D, Souza R, Guillevin L, et al. Pulmonary arterial hypertension in ANCA-associated vasculitis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2006;23:223-8.
176. Jouve P, Humbert M, Chauveheid MP, et al. POEMS syndrome-related pulmonary hypertension is steroid-responsive. *Respir Med.* 2007;101:353-5.
177. Montani D, Achouh L, Marcelin AG, et al. Reversibility of pulmonary arterial hypertension in HIV/HHV8-associated Castleman's disease. *Eur Respir J.* 2005;26:969-72.
178. Humbert M, Monti G, Brenot F, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1628-31.
179. Isern RA, Yaneva M, Weiner E, et al. Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med.* 1992;93:307-12.
180. Mouthon L, Guillevin L, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *Eur Respir J.* 2005;26:986-8.
181. Tamby MC, Chauseaud Y, Humbert M, et al. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* 2005;60:765-72.
182. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, et al. Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2006;28:799-807.
183. Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, et al. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol.* 2007;38:893-902.
184. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, et al. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007;29:462-8.
185. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1994;144:275-85.

186. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-21.
187. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338:436-45.
188. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385:640-4.
189. Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1999;29:2551-9.
190. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, et al. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998;273:23799-804.
191. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-30.
192. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res.* 2001;89:401-7.
193. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, et al. CX(3)C Chemokine Fractalkine in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1419-25.
194. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007;29:937-43.
195. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature.* 1990;347:669-71.
196. Wong M, Silverman ED, Fish EN. Evidence for RANTES, monocyte chemotactic protein-1, and macrophage inflammatory protein-1 beta expression in Kawasaki disease. *J Rheumatol.* 1997;24:1179-85.
197. Noris M, Daina E, Gamba S, et al. Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions? *Circulation.* 1999;100:55-60.
198. Cockwell P, Howie AJ, Adu D, et al. In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998;54:827-36.

199. Dorfmuller P, Zarka V, Durand-Gasselín I, et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:534-9.
200. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, et al. Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:1280-9.
201. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001;15:427-38.
202. Miyata M, Sakuma F, Ito M, et al. Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;121:246-52.
203. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:359-71.
204. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, et al. 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*. 1999;155:411-9.
205. Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK, et al. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2002;55:361-8.
206. Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, et al. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104:2242-8.
207. Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int*. 2000;50:472-9.
208. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, et al. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 1998;11:554-9.
209. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005;115:2811-21.

210. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005;353:1412-3.
211. Souza R, Sitbon O, Parent F, et al. Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2006;61:736.
212. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, et al. Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension Patients with Inadequate Response to Established Therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;in press.
213. Thistlethwaite PA, Lee SH, Du LL, et al. Human angiopoietin gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122:65-73.
214. Sullivan CC, Du L, Chu D, et al. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12331-6.
215. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, et al. Angiopoietin/Tie2 Pathway Influences Smooth Muscle Hyperplasia in Idiopathic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006.
216. Chu D, Sullivan CC, Du L, et al. A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1. *Ann Thorac Surg*. 2004;77:449-56; discussion 56-7.
217. Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Gene transfer of a TIE2 receptor antagonist prevents pulmonary hypertension in rodents. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:268-76.
218. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, et al. 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*. 2005;96:442-50.
219. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S55-66.
220. Ikeda Y, Yonemitsu Y, Kataoka C, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2021-8.
221. Eddahibi S, Raffestin B, Clozel M, et al. Protection from pulmonary hypertension with an orally active endothelin receptor antagonist in hypoxic rats. *Am J Physiol*. 1995;268:H828-35.
222. Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, et al. Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2003;107:1329-35.

223. Atkinson C, Stewart S, Imamura T, et al. Immunolocalisation of BMPR-II and TGF- $\beta$  type I and II receptors in primary plexogenic pulmonary hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:149.
224. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
225. Rodman DM, Stelzner TJ, Zamora MR, et al. Endothelin-1 increases the pulmonary microvascular pressure and causes pulmonary edema in salt solution but not blood-perfused rat lungs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:658-63.
226. Woods M, Mitchell JA, Wood EG, et al. Endothelin-1 is induced by cytokines in human vascular smooth muscle cells: evidence for intracellular endothelin-converting enzyme. *Mol Pharmacol*. 1999;55:902-9.
227. Blumberg FC, Wolf K, Sandner P, et al. The NO donor molsidomine reduces endothelin-1 gene expression in chronic hypoxic rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L258-63.
228. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-90.
229. Star GP, Giovinazzo M, Langleben D. Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells A potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res*. 2010.
230. Hocher B, Rohmeiss P, Zart R, et al. Function and expression of endothelin receptor subtypes in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1996;31:499-510.
231. Wu SQ, Hopfner RL, McNeill JR, et al. Altered paracrine effect of endothelin in blood vessels of the hyperinsulinemic, insulin resistant obese Zucker rat. *Cardiovasc Res*. 2000;45:994-1000.
232. Li H, Elton TS, Chen YF, et al. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. *Am J Physiol*. 1994;266:L553-60.
233. Soma S, Takahashi H, Muramatsu M, et al. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20:620-30.

234. Lutz J, Gorenflo M, Habighorst M, et al. Endothelin-1- and endothelin-receptors in lung biopsies of patients with pulmonary hypertension due to congenital heart disease. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:423-8.
235. Kitten AM, Andrews CJ. Endothelin-1 expression in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts: regulation by BMP-7. *J Cell Physiol.* 2001;187:218-25.
236. Kitten AM, Harvey SA, Criscimagna N, et al. Osteogenic protein-1 downregulates endothelin A receptors in primary rat osteoblasts. *Am J Physiol.* 1997;272:E967-75.
237. Yamanaka R, Otsuka F, Nakamura K, et al. Involvement of the bone morphogenetic protein system in endothelin- and aldosterone-induced cell proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from human patients with pulmonary arterial hypertension. *Hypertens Res.* 2010;33:435-45.
238. Dewachter L, Adnot S, Guignabert C, et al. Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2009;34:1100-10.
239. Davies P, Reid L. Hypoxic remodeling of the rat pulmonary arterial microcirculation assessed by microdissection. *J Appl Physiol.* 1991;71:1886-91.
240. Wagenvoort CA. Vasoconstrictive primary pulmonary hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Cardiovasc Clin.* 1972;4:97-113.
241. Sitbon O, Brenot F, Denjean A, et al. Inhaled nitric oxide as a screening vasodilator agent in primary pulmonary hypertension. A dose-response study and comparison with prostacyclin. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:384-9.
242. Sitbon O, Humbert M, Jais X, et al. Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2005;111:3105-11.
243. Adnot S, Eddahibi S. Lessons from oncology to understand and treat pulmonary hypertension. *Int J Clin Pract Suppl.* 2007:19-25.
244. Rai PR, Cool CD, King JA, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:558-64.
245. Voelkel NF, Cool C, Lee SD, et al. Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest.* 1998;114:225S-30S.
246. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
247. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 2005;97:512-23.

248. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest*. 2009;119:512-23.
249. Guignabert C, Tu L, Izikki M, et al. Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *Faseb J*. 2009;23:4135-47.
250. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, et al. 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*. 2002;105:244-50.
251. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358:2039-49.
252. Eddahibi S, Humbert M, Sediame S, et al. 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*. 2000;162:1493-9.