



HAL
open science

Rôle de la protéine p53 dans l'hypertension artérielle pulmonaire humaine et expérimentale

Sophie Jacquin

► **To cite this version:**

Sophie Jacquin. Rôle de la protéine p53 dans l'hypertension artérielle pulmonaire humaine et expérimentale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114838 . tel-01424108

HAL Id: tel-01424108

<https://theses.hal.science/tel-01424108v1>

Submitted on 2 Jan 2017

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-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE 425 :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : *PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE*

DISCIPLINE : *Physiologie, Physiopathologie*

ANNÉES : 2011 - 2014

SÉRIE DOCTORAT N° 1293

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 07/11/2014

par

Sophie JACQUIN

Rôle de la protéine p53 dans l'hypertension
artérielle pulmonaire humaine et expérimentale

Directeur de thèse :	Saadia EDDAHIBI	DR 2, INSERM Montpellier
Co-directeur de thèse :	Olaf MERCIER	MCU-PH, CCML, INSERM Paris-Sud
<u>Composition du jury :</u>		
<i>Président du jury :</i>	Sylvain RICHARD	DR 1, CNRS Montpellier
<i>Rapporteurs :</i>	Pierre HAINAUT	Professeur, Université de Grenoble
	Christelle GUIBERT	CR 1, INSERM Bordeaux
<i>Examineurs :</i>	Sylvain RICHARD	DR 1, CNRS Montpellier
	Vladimir VEKSLER	Professeur, INSERM Paris-Sud

Table des matières

Table des matières	2
Liste des figures.....	6
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Avant-propos	11
Introduction	12
Chapitre 1: l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	12
1 Définition de l'HTAP	12
1.1 Définition et épidémiologie de l'HTAP	12
1.2 Signes cliniques, diagnostic et suivi de l'HTAP	13
1.3 Classification clinique de l'HTAP.....	16
2 Aspects physio-pathologiques caractéristiques de l'HTAP.....	18
2.1 Vasoconstriction.....	20
2.1.1 Activation de la voie vasoconstrictrice de l'endothéline.....	20
2.1.2 Altération de la voie vasodilatatrice du monoxyde d'azote (NO)	20
2.1.3 Altération de la voie vasodilatatrice des prostacyclines	21
2.1.4 Activation de la voie vasoconstrictrice et hyper-proliférative de la sérotonine	21
2.1.5 Altération de la voie vasodilatatrice de VIP	21
2.1.6 Activation de la voie vasoconstrictrice et hyper-proliférative RhoA/ROCK.....	22
2.1.7 Dysfonction de canaux potassiques.....	22
2.2 Muscularisation des petites artères pulmonaires	23
2.3 Inflammation chronique	24
2.3.1 Surexpression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires	26
2.3.2 Infiltrats de cellules inflammatoires	27
2.3.3 Production d'auto-anticorps	28
2.4 Anomalies morphologiques.....	29
2.4.1 Néo-intima.....	29
2.4.2 Lésions fibrosantes intimaes.....	29
2.4.3 Lésions thrombotiques <i>in situ</i>	29
2.4.4 Lésions plexiformes.....	30
2.4.5 Accumulation de matrice extracellulaire	31
3 Traitements de l'HTAP	32

3.1	Traitements non spécifiques	34
3.1.1	Diurétiques	34
3.1.2	Anticoagulants oraux.....	34
3.1.3	Oxygène.....	34
3.1.4	Antagonistes calciques	34
3.2	Traitements pharmacologiques spécifiques de l'HTAP	35
3.2.1	Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline	36
3.2.2	Les inhibiteurs de la PDE5	37
3.2.3	Les analogues de prostacyclines.....	37
3.2.4	Les thérapies combinées.....	38
3.3	Traitements interventionnels	39
Chapitre 2: Phénotype pseudo-tumoral dans l'HTAP		41
1	Génération intrinsèque de signaux de croissance	42
2	Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance ou anti-prolifératifs.....	45
2.1	Mutation du récepteur BMPR2 - altération de la voie du TGF- β	45
2.2	Perte de signaux inhibiteurs de croissance dans les lésions plexiformes	47
3	Résistance à l'apoptose.....	47
3.1	Sur-expression des protéines anti-apoptotiques	48
3.2	Activation de la voie STAT3.....	49
4	Absence de limite à la réplication cellulaire.....	52
5	Angiogénèse	54
6	Inflammation	55
7	Instabilité génomique	55
8	Désordres métaboliques cellulaires	57
9	Invasion tissulaire et métastase	61
Chapitre 3: La protéine p53 « supresseur de tumeur »		62
1	Structure de p53.....	62
1.1	Le gène <i>TP53</i>	62
1.2	La protéine p53.....	63
1.3	Les protéines homologues de p53	64
2	Fonctions cellulaires de p53	66
2.1	Contrôle du cycle cellulaire.....	66
2.2	Réparation de l'ADN.....	67
2.3	Apoptose.....	68
2.4	Métabolisme	69
2.5	Autophagie	71

2.6	Angiogénèse	72
3	Régulations de p53	72
3.1	Inactivation de p53 en condition normale	73
3.2	Activation de p53 en condition de stress cellulaire	75
3.3	Impact de la localisation subcellulaire de p53.....	79
4	P53 dans la cancérogénèse	80
4.1	Inactivation par mutations du gène TP53 et ses répercussions dans la cancérogénèse .	81
4.1.1	Mutations sur le gène <i>TP53</i>	81
4.1.2	Perte des fonctions physiologiques de la protéine p53	82
4.1.3	Activité dominante négative de la protéine p53 mutée	83
4.1.4	Gain de fonctions oncogéniques de la protéine p53 mutée	83
4.2	Autres types d'inactivations de p53: inactivations fonctionnelles	84
4.2.1	Mutations sur les protéines activatrices de p53	84
4.2.2	Surexpression de protéines régulatrices de p53.....	85
4.2.3	Interactions de p53 avec des protéines virales ou mutées	86
4.3	Thérapies anti-cancéreuses ciblant p53	86
4.3.1	Thérapie génique	87
4.3.2	Vaccination.....	88
4.3.3	Molécules restaurant les fonctions de p53.....	88
4.3.4	Molécules inhibitrices de la dégradation de p53	89
4.3.5	Inhibiteur de p53.....	91
	Objectifs	93
	Méthodologie.....	95
	Echantillons humains et culture cellulaire.....	95
1	Patients	95
2	Isolement des CML-AP, culture et traitements cellulaires.....	95
	Modèles expérimentaux <i>in vivo</i> d'HTAP sur rats	96
1	Modèles d'études.....	96
1.1	Modèle monocrotaline.....	96
1.2	Etude <i>in vivo</i> de l'inactivation pharmacologique de p53.....	96
2	Evaluation du développement d'une HTAP chez les rats	97
2.1	Paramètres hémodynamiques	97
2.2	Hypertrophie cardiaque droite	97
2.3	Muscularisation des artères pulmonaires.....	97
2.4	Coloration et marquages immuno-histochimiques sur coupes pulmonaires de rats.....	98
	Etude de la séquence du gène <i>TP53</i>	99

Etude de l'expression génique.....	100
Etude de l'expression protéique	102
1 Western-blot.....	102
2 Marquages immuno-fluorescents sur CML-AP	103
3 Marquages immuno-histochimiques (IHC) sur tissus pulmonaires humains	104
Etudes des fonctions cellulaires.....	105
1 Prolifération/viabilité.....	105
2 Apoptose.....	105
Analyses statistiques.....	106
Résultats	107
Partie 1: Rôle de p53 au cours du développement de l'HTAP expérimentale et conséquences physiopathologiques de l'inactivation pharmacologique de p53 dans un modèle <i>in vivo</i>	107
Partie 2: Expression de p53 dans les cellules musculaires lisses vasculaires dans l'HTAPi humaine	133
1 Introduction	133
2 Résultats	134
2.1 La voie de p53 dans les CML-AP humaines HTAPi <i>versus</i> contrôles.....	134
2.2 Impact de stress cellulaires sur l'activation de la voie de p53 dans les CML-AP humaines HTAPi <i>versus</i> contrôles et potentiel thérapeutique de la Nutlin-3a.....	138
2.3 Etude préliminaire de la protéine p73 dans l'HTAPi humaine.....	142
Discussion générale et perspectives	145
Annexes.....	158
Références bibliographiques	166

Liste des figures

Figure 1: Approche diagnostique de l'HTAP.....	15
Figure 2: Structure schématique de la paroi artérielle (A) et illustration d'une artère pulmonaire remodelée au cours de l'HTAP (B).	18
Figure 3: Anomalies dans la circulation pulmonaire rencontrées au cours de l'HTAP.	19
Figure 4: Conséquences intracellulaires de la dysfonction des canaux potassiques dans le remodelage vasculaire dans l'HTAP.....	23
Figure 5: Caractéristiques inflammatoires participant au remodelage des artères pulmonaires dans l'HTAP.....	25
Figure 6: Illustration de lésions plexiformes chez un patient HTAPi.	30
Figure 7: Algorithme des traitements de l'HTAP	33
Figure 8: Thérapies ciblées de l'HTAP	35
Figure 9: Caractéristiques communes entre HTAP et cancer.....	42
Figure 10: Principales voies oncogéniques activées dans la physiopathologie de l'HTAP	46
Figure 11: Conséquences moléculaires de l'activation de la voie STAT3 dans la physiopathologie de l'HTAP.....	52
Figure 12: Conséquences moléculaires de l'activation normoxique de HIF-1 α	59
Figure 13: Rôle de la mitochondrie dans la physiopathologie de l'HTAP.....	60
Figure 14: Structure schématique du gène <i>TP53</i>	62
Figure 15: Structure schématique du gène <i>TP53</i> et des domaines fonctionnels de la protéine p53	63
Figure 16: Illustration de la structure tétramérique de p53 se liant à une molécule d'ADN au centre..	64
Figure 17: Structures schématiques du gène et des différentes isoformes de p63/p73.	65
Figure 18: Illustration schématique de la variabilité des fonctions cellulaires de p53, dépendantes de l'intensité du stress	71
Figure 19: Régulation de la protéine p53	73
Figure 20: Panorama des modifications post-traductionnelles de p53	77
Figure 21: Prévalence des mutations somatiques du gène <i>TP53</i> dans différents cancers	81
Figure 22: Spectre des mutations sur le gène <i>TP53</i> dans les cancers humains	82
Figure 23: Stratégies thérapeutiques ciblant la voie de la protéine p53	91
Figure 24: Séquençage du gène <i>TP53</i> dans des CML-AP HTAPi.....	135
Figure 25: Expression protéique de la voie de p53 dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	136
Figure 26: Expressions de p53 et de TAp73 dans des artères pulmonaires de patients contrôles et HTAPi	137

Figure 27: Expression protéique de la voie de p53 en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	139
Figure 28: Translocation nucléaire de p53 en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	141
Figure 29: Prolifération/viabilité cellulaire en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	142
Figure 30: Expressions protéiques de TAp73 et dNp73 dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	143

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification fonctionnelle NYHA adaptée à l'HTAP.....	14
Tableau 2: Classification actualisée de l'hypertension pulmonaire	17
Tableau 3: Définition et application des grades des recommandations.....	32
Tableau 4: Définition des niveaux de preuve des recommandations	32
Tableau 5: Séquences des amorces pour les PCR d'amplification des exons du gène <i>TP53</i>	100
Tableau 6: Séquences des amorces utilisées pour les RT-qPCR.....	101
Tableau 7: Expressions géniques de p53, de certaines de ses cibles et de ses principaux régulateurs dans les CML-AP contrôles et HTAPi.....	135

Liste des abréviations

- HTP: hypertension pulmonaire
- HTAP: hypertension artérielle pulmonaire
- HTAPi: hypertension artérielle pulmonaire idiopathique
- HTAPh: hypertension artérielle pulmonaire héritable
- PAPm: pression artérielle pulmonaire moyenne
- AP: artère pulmonaire
- CML (-AP): cellules musculaires lisses (des artères pulmonaires)
- CE (-AP): cellules endothéliales (des artères pulmonaires)
- NYHA: *New York Heart Association*
- BMPR2: *bone morphogenic protein receptor 2*
- ET-1: endothéline 1
- NO: monoxyde d'azote
- eNOS: synthétase endothéliale de monoxyde d'azote
- 5-HT: sérotonine
- VIP: *vasoactive intestinal peptide*
- VEGF: *vascular endothelial growth factor*
- PDGF: *platelet-derived growth factor*
- EGF: *epidermal growth factor*
- FGF: *fibroblast growth factor*
- TGF- β : *transforming growth factor-beta*
- AMPc: adénosine monophosphate cyclique
- GMPc: guanosine monophosphate cyclique
- PDE: phosphodiesterases
- Kv: canaux potassiques voltage dépendants
- STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*
- NFAT: *nuclear factor of activated T-cells*
- MAPK: *mitogen-activated protein kinases*
- Ca⁺⁺: ion calcique
- IL: interleukine
- ERO: espèces réactives de l'oxygène
- ROS: *reactive oxygen species*
- H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
- HIF: *hypoxia inducible factor*

- MDM2: *mouse double minute 2*
- CDK: *cyclin-dependent kinase*
- BCL-2: *B-cell lymphoma 2*
- BAX: *BCL2-associated X*
- BAD: *BCL-2-associated death promoter*
- PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*
- PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*
- AKT: *serine/threonine protein kinase*
- PTEN: *phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten*
- KO: *knock out*
- MCT: *monocrotaline*
- iv: *intraveineux*
- sc: *sous-cutané*
- N3: *Nutlin-3a*
- SNP: *single nucleotide polymorphism*

Avant-propos

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une des maladies touchant la circulation pulmonaire appelée également « petite circulation ». Cette circulation présente des particularités par rapport à la circulation systémique, appelée aussi « grande circulation », distinguant complètement l'HTAP de l'hypertension artérielle systémique par des mécanismes pathogéniques qui lui sont propres. En effet, la circulation pulmonaire est un système à haut débit (recevant la totalité du débit cardiaque), de basses pressions, de faibles résistances vasculaires, recrutables et compliant. La pathogénèse de l'HTAP est complexe, impliquant certainement des facteurs environnementaux et des prédispositions individuelles, conduisant à un remodelage vasculaire dans la circulation pulmonaire aboutissant à une élévation des pressions au sein de cette circulation.

Bien que les mécanismes physiopathologiques de l'HTAP ne soient pas encore clairement identifiés, des caractéristiques décrivant un « phénotype pseudo-tumoral » ont été observées au cours du développement de l'HTAP. Dès lors, l'objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre la physiopathologie de l'HTAP en s'intéressant à une voie jouant un rôle particulièrement prépondérant dans la cancérogénèse: la protéine p53, un des plus importants suppresseurs de tumeur inactivés dans la plupart des cancers humains.

Afin de bien comprendre le rationnel de notre travail, la première partie de ce manuscrit est constituée d'une introduction décrivant l'HTAP, les caractéristiques du phénotype pseudo-tumoral dans la physiopathologie de l'HTAP et enfin la protéine p53 et son inactivation dans la cancérogénèse.

Introduction

Chapitre 1: l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

1 Définition de l'HTAP

1.1 Définition et épidémiologie de l'HTAP

Le terme d' « hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) décrit une maladie vasculaire pulmonaire grave caractérisée par une augmentation progressive des pressions artérielles pulmonaires, dont le principal symptôme est l'essoufflement à l'effort. Elle est définie par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure ou égale à 25 mmHg au repos (la valeur normale de la PAPm étant de 15 mmHg), mesurée lors d'un cathétérisme cardiaque droit. Cette maladie peut être fatale car une élévation chronique des pressions dans les artères pulmonaires (AP) conduit à une hypertrophie cardiaque droite, aboutissant à une insuffisance ventriculaire droite pouvant entraîner le décès du patient.

C'est également une maladie rare puisque son incidence annuelle (nouveaux cas diagnostiqués en un an) en France est de 2,4 cas/million d'habitants et sa prévalence (nombre de cas à un moment donné dans la population française) est de 15 cas/million d'habitants (Humbert *et al.*, 2006). Par ailleurs, c'est une maladie qui survient à tout âge, avec un pic de fréquence à 30-50 ans, et plus particulièrement chez les femmes (ratio 1,7 : 1 dans l'HTAPi) sans que l'on en sache réellement la raison (Safdar, 2013).

Malgré les progrès réalisés ces dernières années en termes de nouveaux traitements pharmacologiques, le pronostic de cette maladie reste mauvais, associé à une qualité de vie médiocre. En effet, le taux de survie observé dans la population française grâce à une analyse réalisée sur 674 patients recrutés dans 17 centres d'octobre 2002 à octobre 2003 est de 67% à 3 ans (Humbert *et al.*, 2010). Plus récemment, une plus large étude (registre REVEAL) incluant 2635 patients dans 55 centres américains de mars

2006 à décembre 2009 établit un taux de survie similaire, de 68% à 3 ans et 57% à 5 ans (Benza *et al.*, 2012).

1.2 **Signes cliniques, diagnostic et suivi de l'HTAP**

Les signes cliniques de l'HTAP ne sont malheureusement pas spécifiques de l'HTAP, ce qui a pour conséquence un retard de diagnostic et de prise en charge (environ 2 ans), participant ainsi au mauvais pronostic de cette maladie. Dans 98% des cas, une dyspnée à l'effort puis au repos se met en place progressivement, signe clinique qui s'avère être souvent négligé. Les manifestations cliniques de l'HTAP traduisent classiquement une atteinte cardiaque droite et peuvent être accompagnés de signes cliniques d'une maladie sous-jacente associée à l'HTAP. En cas d'aggravation de la maladie vers une insuffisance cardiaque droite, des signes de cette insuffisance cardiaque apparaissent: douleurs thoraciques, asthénie, palpitations, hémoptysies, syncopes...

Devant de tels symptômes, en particulier une dyspnée non expliquée et/ou un historique pouvant faire penser à une HTAP, si la suspicion d'HTAP se confirme par des examens préliminaires, il est nécessaire de réaliser un cathétérisme cardiaque droit, examen de référence permettant d'établir formellement le diagnostic d'HTAP (Figure 1: Approche diagnostique de l'HTAP). Cette technique mesurant les paramètres hémodynamiques cardio-vasculaires (pressions et débits) au niveau des cavités cardiaques droites et de l'artère pulmonaire, le diagnostic d'HTAP est confirmé si la PAPm mesurée est supérieure ou égale à 25 mmHg au repos (une élévation des résistances vasculaires pulmonaires supérieures à 3 unités Wood y est généralement associée).

La sévérité de l'HTAP est évaluée au moment du diagnostic, après instauration d'un traitement et tout au long du suivi du patient, afin de mettre en place une stratégie thérapeutique la plus appropriée possible. Ainsi il est nécessaire de prendre en compte: l'historique du patient, la classe fonctionnelle NYHA (New York Heart Association), le test de marche de six minutes (qui permet d'évaluer l'impact de la maladie sur l'activité physique), les paramètres échographiques et hémodynamiques, le pic de VO₂, les taux biologiques de certains biomarqueurs (BNP, troponine) et l'apparition d'éventuels signes d'une insuffisance cardiaque droite (Hoepfer *et al.*, 2013; McLaughlin *et al.*, 2009; McLaughlin

et al., 2011). Ainsi, une classification clinique fonctionnelle de l'HTAP composée de quatre classes est proposée par la NYHA se basant sur l'atteinte de la dyspnée sur l'activité physique et la vie quotidienne du patient (Tableau 1: Classification fonctionnelle NYHA adaptée à l'HTAP).

Classe fonctionnelle	Description
Classe 1	HTAP sans limitation de l'activité physique. Une activité physique ordinaire ne cause pas de dyspnée, de fatigue, de douleur thoracique excessive, ni de syncope.
Classe 2	HTAP avec une légère limitation de l'activité physique. Le patient est à l'aise au repos mais une activité physique ordinaire cause une dyspnée, une fatigue et une douleur thoracique excessive, voire même une syncope.
Classe 3	HTAP avec une limitation marquée de l'activité physique. Le patient est à l'aise au repos mais la moindre activité physique cause une dyspnée, une fatigue, une douleur thoracique excessive, ou une syncope.
Classe 4	HTAP avec une incapacité de réaliser une quelconque activité physique sans symptômes. Le patient présente des signes d'insuffisance cardiaque droite. La dyspnée et la fatigue peuvent être présentes au repos et l'inconfort augmente à la moindre activité physique.

Tableau 1: Classification fonctionnelle NYHA adaptée à l'HTAP.

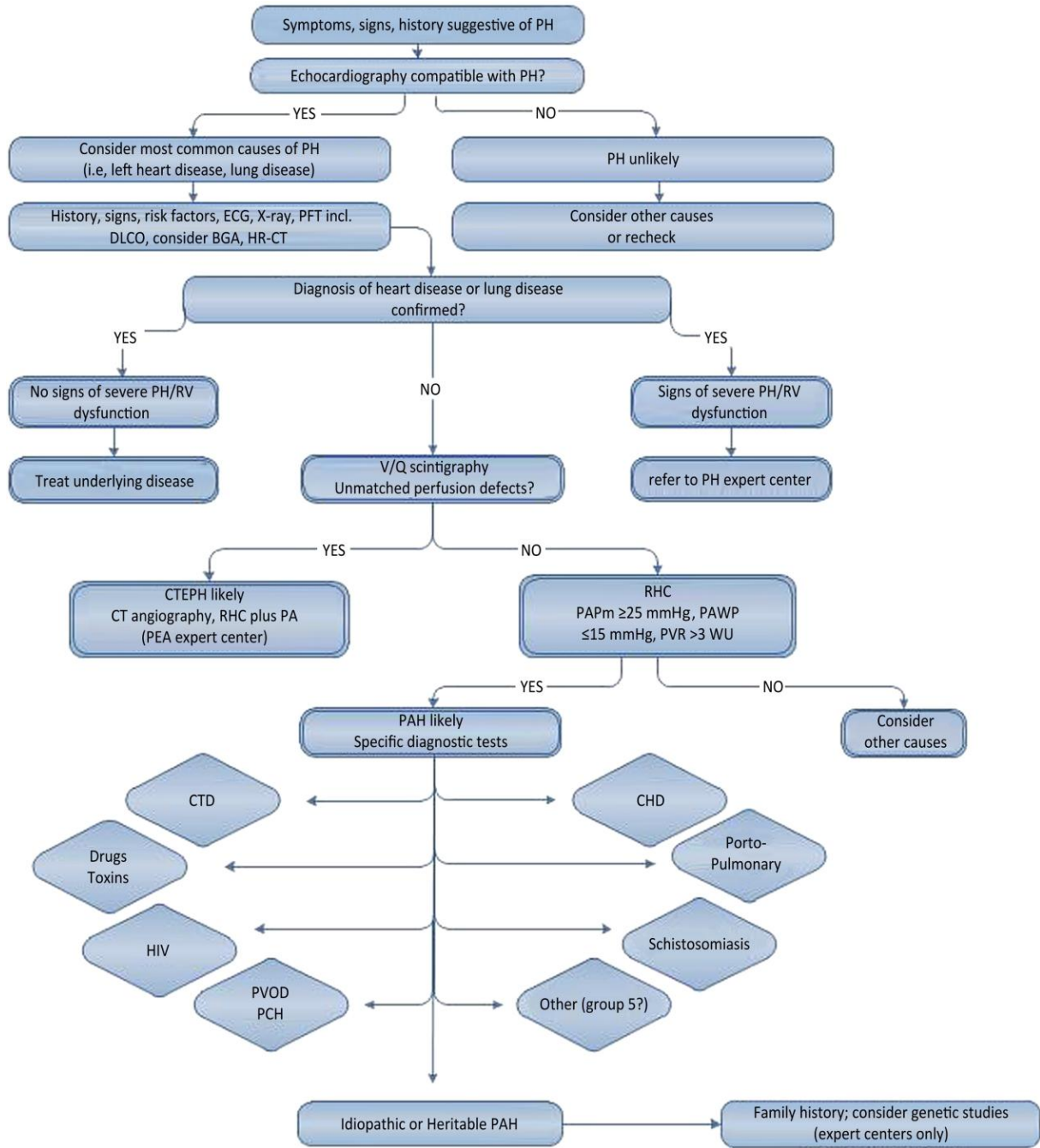


Figure 1: Approche diagnostique de l'HTAP. Source: (Hoepfer *et al.*, 2013)

BGA = blood gas analysis; CHD = congenital heart disease; CTD = connective tissue disease; CTEPH = chronic thromboembolic pulmonary hypertension; DLCO = diffusion capacity of the lung for carbon monoxide; ECG = electrocardiogram; HR-CT = high-resolution computed tomography; PA = pulmonary angiography; PAH = pulmonary arterial hypertension; PAPm = mean pulmonary artery pressure; PAWP = pulmonary arterial wedge pressure; PCH = pulmonary capillary hemangiomatosis; PEA = pulmonary endarterectomy; PFT = pulmonary function testing; PH = pulmonary hypertension; PVOD = pulmonary veno-occlusive disease; PVR = pulmonary vascular resistance; RHC = right heart catheter; RV = right ventricle; V/Q = ventilation/perfusion; x-ray = chest radiograph.

1.3 Classification clinique de l'HTAP

La première classification clinique de l'hypertension pulmonaire (HTP) a été établie en 1973 afin de classer l'HTP en différents groupes présentant des similitudes dans leurs physiopathologies, leurs caractéristiques hémodynamiques et leurs approches thérapeutiques. Depuis, cette classification a été revue et corrigée en 1998, 2003 et 2008, pour être une nouvelle fois affinée lors du cinquième symposium mondial sur l'HTP en 2013 à Nice (Simonneau *et al.*, 2013) (Tableau 2: Classification actualisée de l'hypertension pulmonaire). Cette dernière classification a permis d'identifier cinq grands groupes: l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), l'hypertension pulmonaire causée par des cardiopathies gauches, l'hypertension pulmonaire causée par des maladies respiratoires et/ou liée à hypoxie, l'hypertension pulmonaire post-embolique chronique (CTEPH) et l'hypertension pulmonaire liée à des mécanismes multifactoriels incertains. Dans cette thèse, nous nous intéressons aux mécanismes physiopathologiques du groupe HTAP qui lui-même est divisé en quatre sous-groupes: les HTAP idiopathiques (HTAPi) définies par la survenue de la maladie en l'absence de facteur de risque connu associé, les HTAP héritables (HTAPh, anciennement dénommées HTAP familiales) définies par plusieurs cas d'HTAP au sein d'une même famille et/ou par la présence dans le génome du patient d'une mutation dans un des gènes connus pour prédisposer au développement de l'HTAP (*BMPR2*, *ALK1*, *ENG*, *SMAD9*, *CAVI*, *KCNK3*), les HTAP associées à la prise de médicaments et les HTAP associées à diverses pathologies (connectivites, infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), hypertension portale, cardiopathie congénitale, schistosomiase).

Tableau 1: Classification actualisée de l'Hypertension Pulmonaire* (d'après Simonneau et al, 2013)

1. Pulmonary arterial hypertension
 - 1.1 Idiopathic PAH
 - 1.2 Heritable PAH
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK-1, ENG, **SMAD9**, **CAV1**, **KCNK3**
 - 1.2.3 Unknown
 - 1.3 Drug and toxin induced
 - 1.4 Associated with:
 - 1.4.1 Connective tissue disease
 - 1.4.2 HIV infection
 - 1.4.3 Portal hypertension
 - 1.4.4 Congenital heart diseases
 - 1.4.5 Schistosomiasis
- 1' Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary hemangiomatosis
- 1'' Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN)**
2. Pulmonary hypertension due to left heart disease
 - 2.1 Left ventricular systolic dysfunction
 - 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction
 - 2.3 Valvular disease
 - 2.4 Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies**
3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia
 - 3.1 Chronic obstructive pulmonary disease
 - 3.2 Interstitial lung disease
 - 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern
 - 3.4 Sleep-disordered breathing
 - 3.5 Alveolar hypoventilation disorders
 - 3.6 Chronic exposure to high altitude
 - 3.7 Developmental lung diseases
4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)
5. Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms
 - 5.1 Hematologic disorders: **chronic hemolytic anemia**, myeloproliferative disorders, splenectomy
 - 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis
 - 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders
 - 5.4 Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure, **segmental PH**

BMPR = bone morphogenic protein receptor type II; CAV1 = caveolin-1; ENG = endoglin;

HIV = human immunodeficiency virus; PAH = pulmonary arterial hypertension.

*5th WSPH Nice 2013. Main modifications to the previous Dana Point classification are in **bold**.

Tableau 2: Classification actualisée de l'hypertension pulmonaire. Source: (Simonneau *et al.*, 2013)

ALK1: Activin receptor-like kinase 1, SMAD9: Mothers against decapentaplegic homolog 9, KCNK3: Potassium channel subfamily K member 3

2 Aspects physio-pathologiques caractéristiques de l'HTAP

L'HTAP est une pan-vasculopathie pulmonaire puisqu'elle touche toutes les couches de la paroi des petites artères pulmonaires pré-capillaires: l'intima, la média et l'adventice (Figure 2: Structure schématique de la paroi artérielle et illustration d'une artère pulmonaire remodelée au cours de l'HTAP). Plusieurs caractéristiques physio-pathologiques participent à ce « remodelage vasculaire pulmonaire » (Figure 3: Anomalies dans la circulation pulmonaire au cours de l'HTAP), incluant entre autres une vasoconstriction, une muscularisation, une inflammation chronique et des anomalies morphologiques dont des lésions plexiformes et des lésions thrombotiques, conduisant à l'épaississement de la paroi vasculaire et à l'oblitération progressive des artères pulmonaires.

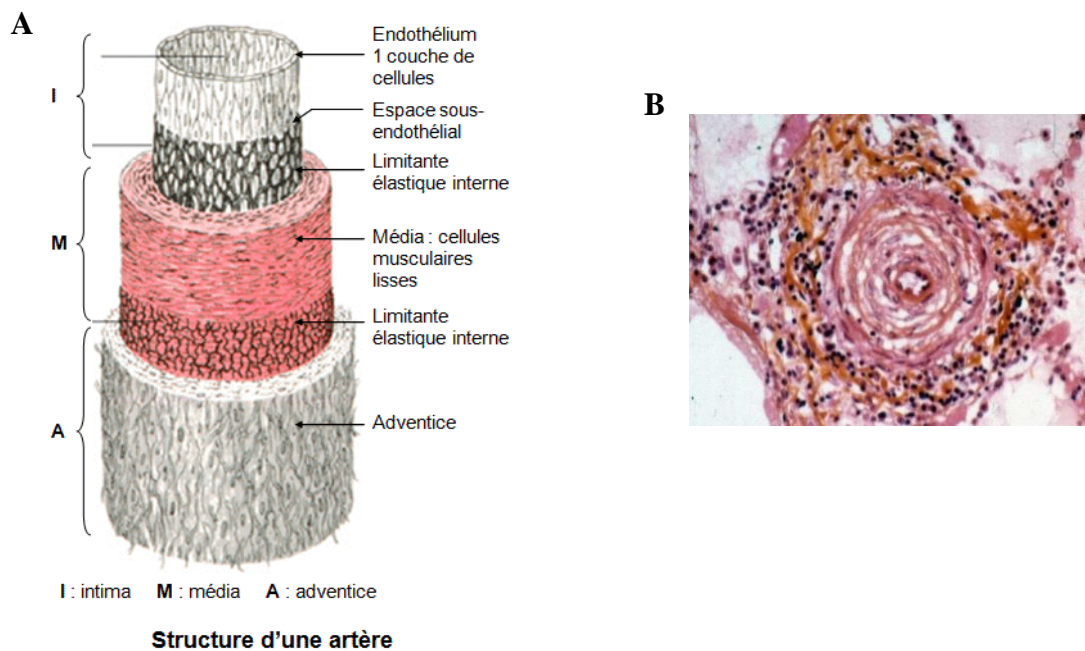


Figure 2: Structure schématique de la paroi artérielle (A) et illustration d'une artère pulmonaire remodelée au cours de l'HTAP (B).

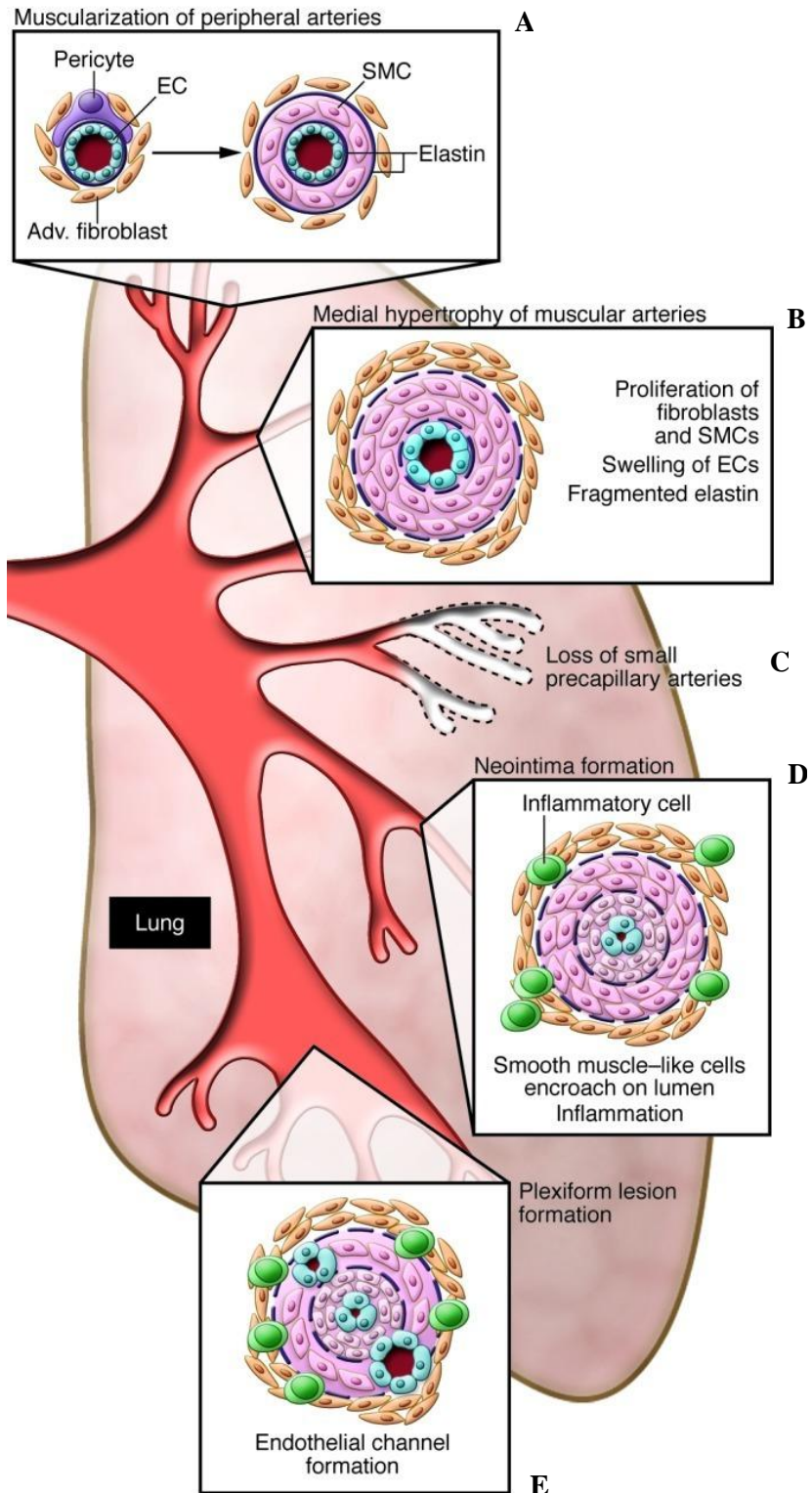


Figure 3: Anomalies dans la circulation pulmonaire rencontrées au cours de l'HTAP. On peut observer une néo-muscularisation des petites artérioles distales pré-capillaires (A), une hypertrophie de la média et de l'adventice des artères proximales (B), une raréfaction vasculaire (C), la formation de néo-intima, associée à l'infiltration de cellules inflammatoires (D) et la formation de lésions plexiformes (E). Source: (Rabinovitch, 2012)

2.1 Vasoconstriction

Au niveau de l'endothélium, l'altération de la balance vasodilatation/vasoconstriction est une des anomalies caractéristiques de l'HTAP. Ainsi les traitements actuellement proposés visent à corriger cette dysfonction endothéliale qui se manifeste à différents niveaux:

2.1.1 Activation de la voie vasoconstrictrice de l'endothéline

Chez les patients HTAP, il a été observé une sur-activation de la voie de l'endothéline avec une augmentation de la synthèse d'ET-1 (Giaid *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1991). Ce peptide est considéré comme un puissant vasoconstricteur dont l'effet est médié par deux types de récepteurs: les récepteurs ET-A localisés sur les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CML-AP) et les récepteurs ET-B localisés sur les CML-AP et les cellules endothéliales des artères pulmonaires (CE-AP). L'endothéline, libérée par l'endothélium, agit principalement sur le muscle lisse sous-jacent où il induit une vasoconstriction (et une prolifération) via l'activation des phospholipases C, conduisant à la formation d'inositol triphosphate (IP3), puis à l'augmentation intracellulaire de calcium (Ca^{++}) (également observée dans l'HTAP).

2.1.2 Altération de la voie vasodilatatrice du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est normalement produit par la synthétase endothéliale de monoxyde d'azote (eNOS) dans les CE puis diffuse dans les CML où il active la guanylate cyclase soluble (GCs) qui produit alors du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) aux propriétés vasodilatatrices et anti-prolifératives. Dans l'HTAP, cette voie est altérée puisque il a été décrit une diminution de l'expression et de l'activité de la eNOS dans les poumons de patients HTAP conduisant à une production réduite de NO (Giaid *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2004). Par ailleurs, une augmentation de l'expression de la phosphodiesterase 5 (PDE5), enzyme dégradant le second messenger GMPc, a été observée dans les CML-AP d'HTAP expérimentales et humaines (Murray *et al.*, 2002; Wharton *et al.*, 2005), conduisant à une baisse du taux intracellulaire de GMPc.

2.1.3 Altération de la voie vasodilatatrice des prostacyclines

La prostacycline (ou prostaglandine I₂ (PGI₂)) est un important vasodilatateur pulmonaire endogène synthétisé par les CE-AP à partir de l'acide arachidonique et exerçant ses activités vasodilatatrice et anti-proliférative sur les CML-AP via l'activation de la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Dans l'HTAP, il a été montré un défaut de synthèse de prostacycline par les CE-AP, via la perte de l'expression du gène de la prostacycline synthase (Christman *et al.*, 1992; Tuder *et al.*, 1999).

2.1.4 Activation de la voie vasoconstrictrice et hyper-proliférative de la sérotonine

La voie vasoconstrictrice de la sérotonine (5-HT) est suractivée dans l'HTAP. En effet une augmentation du taux plasmatique de 5-HT a été observée dans l'HTAP (Herve *et al.*, 1995), probablement liée à une libération excessive de 5-HT contenue dans les plaquettes où elle est majoritairement stockée (MacLean *et al.*, 2000). Les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} semblent médier la vasoconstriction induite par la 5-HT dans les artères pulmonaires humaines via, entre autre, une activation de la signalisation calcique (Morecroft *et al.*, 1999; Rodat-Despoix *et al.*, 2009). Les récepteurs 5-HT₂ sont la cible d'une nouvelle molécule, le tergulide, qui a montré des résultats prometteurs en préclinique et qui est actuellement testée chez les patients HTAP (Dumitrascu *et al.*, 2011; Sitbon *et al.*, 2012). La 5-HT exerce également une action mitotique sur les CML-AP participant au remodelage vasculaire de l'HTAP via le transporteur membranaire de la 5-HT (5-HTT ou SERT). Ainsi une augmentation de l'expression de ce transporteur 5-HTT dans la media des AP remodelées de patients HTAP et dans les CML-AP mises en culture est à l'origine d'une prolifération augmentée en réponse à la 5-HT par rapport à des CML-AP de patients témoins (Eddahibi *et al.*, 2001). Confirmant l'implication du 5-HTT dans le développement de l'HTAP, des souris mutantes surexprimant le 5-HTT (souris SM22-5HTT+) développent spontanément une HTAP (Guignabert *et al.*, 2006).

2.1.5 Altération de la voie vasodilatatrice de VIP

La voie de VIP (vasoactive intestinal peptide) est également altérée dans l'HTAP puisque la concentration sérique de VIP est diminuée chez les patients HTAPi (Petkov *et al.*, 2003). Le VIP exerce normalement une activité vasodilatatrice via ces récepteurs VPAC (ou vasoactive intestinal

peptide receptors) couplés à des adénylates cyclases conduisant à une activation du second messenger AMPc. Cette voie VIP est une nouvelle cible thérapeutique potentielle intéressante au vu des résultats cliniques prometteurs de l'aviptadil, un équivalent de VIP administré par voie inhalée (Leuchte *et al.*, 2008).

2.1.6 Activation de la voie vasoconstrictrice et hyper-proliférative RhoA/ROCK

La voie RhoA (Ras homolog gene family, member A) / ROCK (Rho-associated protein kinase) étant activée par des facteurs de croissance up-régulés dans l'HTAP (PDGF (Platelet-derived growth factor), angiotensine II, 5-HT), elle est également impliquée dans l'HTAP en jouant un rôle dans la contraction et la prolifération des CML-AP (via la phosphorylation de la chaîne légère de myosine) (Antoniou, 2012). En effet, le système RhoA-ROCK est surexprimé et suractivé chez les patients HTAPi et dans des modèles *in vivo* d'HTAP expérimentales (Do *e et al.*, 2009; Guilluy *et al.*, 2009; Nagaoka *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2013). D'un point de vue thérapeutique, des inhibiteurs spécifiques de ROCK, le fasudil et le Y27632, ont d'ores et déjà été testés chez des patients HTAP et dans des modèles *in vivo* expérimentaux d'HTAP, en testant différentes voies d'administration, et ont présenté des résultats très prometteurs (Abe *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2006; Barman *et al.*, 2009; Doggrell, 2005; Fujita *et al.*, 2010; Fukumoto *et al.*, 2005; Nagaoka *et al.*, 2005).

2.1.7 Dysfonction de canaux potassiques

Une diminution de l'expression et de l'activité de certains canaux potassiques K^+ , en particulier des canaux voltage-dépendants Kv1.5 et Kv2.1, a été observée dans les CML-AP de patients HTAP (Bonnet *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2007; Humbert *et al.*, 2004b; Yuan *et al.*, 1998a; Yuan *et al.*, 1998b). Ces canaux K^+ voltage-dépendants étant des régulateurs du potentiel membranaire, une réduction de l'activité des canaux K^+ entraîne une altération du courant K^+ qui diminue la capacité à l'hyperpolarisation membranaire inhibitrice de la prolifération cellulaire. Cette réduction de l'activité des canaux K^+ favorise donc plutôt une dépolarisation membranaire, activant les canaux Ca^{++} voltage-dépendants de type L, ce qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{++} , favorisant la contraction et la prolifération cellulaire, deux composantes majeures de l'HTAP (Bonnet *et al.*, 2007; Platoshyn *et al.*, 2000). De plus, l'altération du courant K^+ entraîne une augmentation de

la concentration intracellulaire en K^+ , ce qui a pour effet d'inhiber l'activité des caspases et nucléases impliquées dans l'apoptose (Mandegar *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2010; Remillard *et al.*, 2004), participant ainsi à la résistance à l'apoptose cellulaire (Figure 4: Conséquences intracellulaires de la dysfonction des canaux potassiques dans le remodelage vasculaire dans l'HTAP). De manière intéressante, la restauration de l'expression de Kv1.5 dans un modèle expérimental de transfert de gène chez le rat a réduit l'hypertension pulmonaire induite par hypoxie chronique (Pozeg *et al.*, 2003).

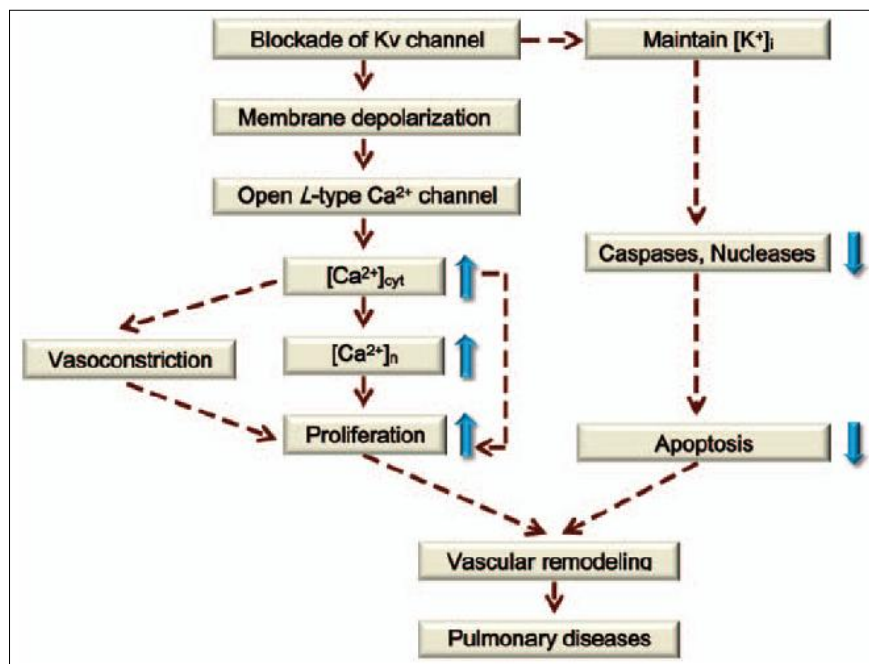


Figure 4: Conséquences intracellulaires de la dysfonction des canaux potassiques dans le remodelage vasculaire dans l'HTAP.
Source: (Park *et al.*, 2010)

2.2 Muscularisation des petites artères pulmonaires

La muscularisation des petites artères pulmonaires (de moins de 500 μm de diamètre) qui normalement le sont peu (artères proximales) voire pas du tout (artérioles distales pré-capillaires) chez des patients sains est une autre composante essentielle de l'HTAP. Elle est liée à l'hypertrophie de la média au cours de laquelle les CML-AP jouent un rôle prépondérant caractérisé par une migration, une hyper-prolifération et une hyperplasie de ces cellules. De nombreuses caractéristiques à l'origine de la prolifération exagérée des CML-AP dans l'HTAP sont présentées dans le chapitre II détaillant les similitudes entre la physiopathologie de l'HTAP et celle du cancer. L'implication d'autres types

cellulaires est également à prendre en compte dans ce processus de muscularisation, en particulier dans les artérioles distales où il s'agit d'une néo-muscularisation qui fait intervenir des processus pathobiologiques initiés dans l'endothélium et l'adventice vasculaire. Dans ce cadre, l'adventice permet l'afflux et/ou l'activation de cellules progénitrices circulantes ou résidentes (cellules souches, fibrocytes ou pericytes). Ces cellules ainsi que les fibroblastes adventitiels résidents sont capables de se différencier en cellules au phénotype musculaire (α -Smooth-Muscle-Actin positives) participant ainsi à la néo-muscularisation artérielle (Davie *et al.*, 2004; Farkas *et al.*, 2014; Frid *et al.*, 2006; Passman *et al.*, 2008; Stenmark *et al.*, 2012; Yeager *et al.*, 2011). De plus, le phénomène de transition endothéliale-mésenchymateuse au cours duquel des cellules endothéliales acquièrent un phénotype musculaire en migrant vers la média semble également participer à ce processus (Arciniegas *et al.*, 2007; Frid *et al.*, 2002; Sakao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2006).

2.3 Inflammation chronique

Etant donné que l'HTAP apparaît fréquemment associée à des maladies auto-immunes et infectieuses impliquant des phénomènes d'inflammation systémique, comme la sclérodermie systémique, le lupus érythémateux ou encore une infection par le VIH, l'inflammation chronique et l'auto-immunité jouent certainement un rôle prépondérant dans la physiopathologie de l'HTAP idiopathique et l'HTAP associée à ces maladies (Groth *et al.*, 2014; Kherbeck *et al.*, 2013; Price *et al.*, 2012). En effet une élévation des taux de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et un influx massif de cellules pro-inflammatoires ont été décrits dans l'HTAP (Dorfmueller *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2012; Soon *et al.*, 2010; Tuder *et al.*, 1998), associée à une accumulation de cellules inflammatoires plus ou moins organisées en pseudo-foyers lymphoïdes et à une production d'auto-anticorps (Figure 5: Caractéristiques inflammatoires participant au remodelage des artères pulmonaires dans l'HTAP).

Traditionnellement il était considéré que le phénomène initiateur était le recrutement de leucocytes et de monocytes circulants au niveau de l'intima via l'expression endothéliale de molécules d'adhésion (hypothèse appelée « inside-out »). Cependant, de plus en plus de données expérimentales indiqueraient que le processus inflammatoire serait initié dans l'adventice en progressant vers l'intérieur du vaisseau, associé ainsi au processus de remodelage intra-vasculaire (hypothèse appelée

«outside-in ») (Stacher *et al.*, 2012; Tudor *et al.*, 2013). En effet, les cellules résidentes de l'adventice que sont les fibroblastes sont activables rapidement en réponse à un stress vasculaire comme l'hypoxie, le shear stress ou encore par une infection, ce qui induit des modifications phénotypiques de ces fibroblastes, influençant la réaction inflammatoire intra-vasculaire. Ces fibroblastes activés prolifèrent, se différencient, migrent, produisent des facteurs de croissance, des molécules du tissu conjonctif et surtout des molécules d'adhésion, des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires qui induisent le recrutement et la rétention des cellules inflammatoires et progénitrices (Frid *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011b; Stenmark *et al.*, 2011). Se crée alors une boucle d'auto-activation dérégulée conduisant à un processus inflammatoire chronique au sein des artères pulmonaires.

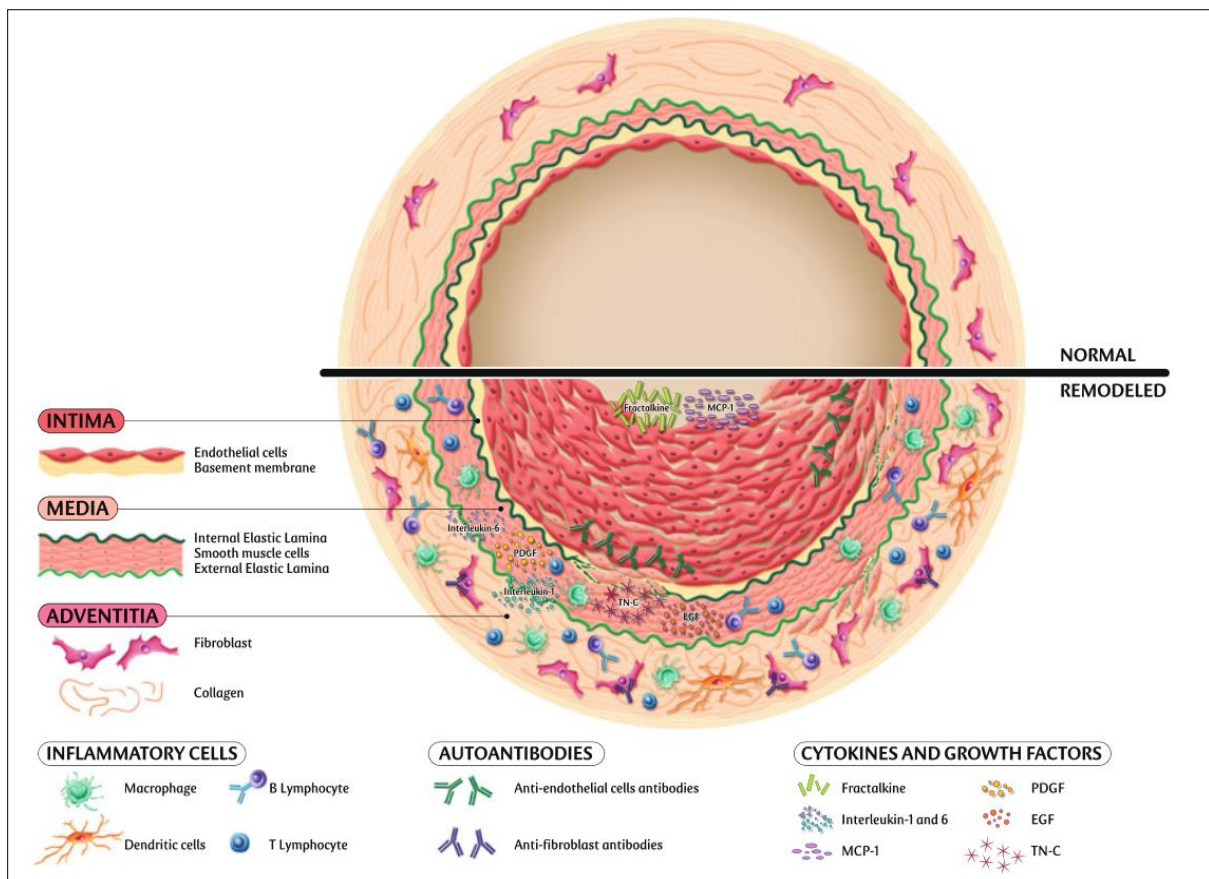


Figure 5: Caractéristiques inflammatoires participant au remodelage des artères pulmonaires dans l'HTAP. Source: (Kherbeck *et al.*, 2013). MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1; PDGF: Platelet-derived growth factor; TN-C: Tenascin-C; EGF: Epidermal Growth Factor.

2.3.1 Surexpression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires

Une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires: interleukines IL-1 β et IL-6, corrélée à la sévérité de la maladie, a été clairement établie chez les patients atteints d'HTAP idiopathique et associée à une sclérodémie systémique (Dolenc *et al.*, 2014; Dorfmueller *et al.*, 2003; Humbert *et al.*, 1995; Selimovic *et al.*, 2009; Soon *et al.*, 2010) ainsi que dans les modèles expérimentaux d'HTAP (Bhargava *et al.*, 1999; Lesprit *et al.*, 1998; Van Hung *et al.*, 2014). Ces cytokines sont retrouvées au niveau circulant et au sein des artères pulmonaires remodelées où elles exercent leur activité pro-inflammatoire mais aussi leur effet pro-prolifératif sur les CE-AP et CML-AP (Savale *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2009).

Par ailleurs, plusieurs chimiokines (cytokines solubles agissant par chimiotactisme) sont surexprimées dans le sérum et le tissu pulmonaire des patients HTAP: la fractalkine ou CX3CL1 qui induit la prolifération des CML-AP et le recrutement et l'adhésion aux CE-AP de leucocytes exprimant le récepteur CX3CR1 (Balabanian *et al.*, 2002; Perros *et al.*, 2007a); le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1) ou CCL2 qui induit la migration de monocytes qui se différencient en macrophages au sein du tissu (Itoh *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007); le RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) ou CCL5, chimio-attractant pour les monocytes et les lymphocytes T et activateur indirect de ET-1 (Dorfmueller *et al.*, 2002); et le CXCL10 qui induit le recrutement et l'adhésion des lymphocytes T activés aux CE et qui inhibe l'angiogénèse (Heresi *et al.*, 2010).

Ces facteurs pro-inflammatoires et pour certains également pro-prolifératifs peuvent être produits par les cellules de la paroi vasculaire pulmonaire, en particulier par les CE-AP et les fibroblastes adventitiels. Les plaquettes interviennent également dans ce processus puisqu'elles possèdent des granules sécrétoires pouvant libérer des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et pro-prolifératifs comme le CXCL4, le RANTES, l'IL-1 β , le TGF- β (Transforming growth factor- β) ou encore le TNF- α (Tumor necrosis factor- α) (Shi *et al.*, 2011). S'en suit un afflux de cellules inflammatoires qui produisent à leur tour ces facteurs en grande quantité, créant ainsi un environnement de sur-activation de l'inflammation au niveau des vaisseaux pulmonaires.

2.3.2 Infiltrats de cellules inflammatoires

Il a été clairement décrit des infiltrats inflammatoires autour des vaisseaux pulmonaires et dans les lésions plexiformes chez les patients HTAP, composés de cellules dendritiques, de macrophages, de lymphocytes B et T et de mastocytes (Dorfmueller *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2009; Savai *et al.*, 2012; Tuder *et al.*, 1994; Van Hung *et al.*, 2014).

Les cellules dendritiques, dont leur nombre est augmenté dans le sérum de patients HTAP ainsi que dans les infiltrats péri-vasculaires (Perros *et al.*, 2007b), peuvent participer au remodelage vasculaire pulmonaire de part leur activité principale de présentation des antigènes et donc d'activation des lymphocytes T, leur rôle dans l'initiation de l'inflammation et leur capacité de différenciation en d'autres phénotypes cellulaires (dont le phénotype endothélial).

Les macrophages pulmonaires issus de la différenciation des monocytes circulants participent au remodelage vasculaire via leur activité de phagocytose, de production de serine-protéases et de cytokines pro-inflammatoires. Les serine-protéases ainsi produites activent les matricé-métalloprotéases qui dégradent alors les membranes basales et la matrice extracellulaire, facilitant la migration de leucocytes ainsi que l'activation et la différenciation des fibroblastes. Par ailleurs, dans une étude *in vivo* d'HTAP induite par hypoxie, il semble que le recrutement de progéniteurs mésenchymateux circulants de la lignée des monocytes/macrophages, appelés fibrocytes, pourrait également être impliqué dans le remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTAP (Frid *et al.*, 2006). En revanche, leur implication dans l'HTAP humaine n'est pas clairement établie puisque le taux de fibrocytes circulants entre patients HTAP et contrôles n'est pas différent voire diminué (Gambaryan *et al.*, 2012).

Les lymphocytes B pourraient participer à la pathogénèse de l'HTAP via leur rôle principal dans l'immunité humorale de production d'anticorps et notamment d'auto-anticorps retrouvés chez les patients HTAP mais également via leur rôle dans l'activation des lymphocytes T effecteurs en collaboration avec les cellules dendritiques et la production de cytokines. Par ailleurs, il semble que le

profil d'expression des ARNm soit clairement différent entre lymphocytes B circulants de patients HTAPi *versus* contrôles avec la surexpression de certains gènes (Ulrich *et al.*, 2008b).

Concernant les lymphocytes T, responsables de l'immunité cellulaire et divisés en trois sous-groupes, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T « helper » et les lymphocytes T régulateurs, il n'y a pas de consensus clairement établi. En effet, dans une première étude, le taux de lymphocytes T régulateurs (CD4+, FoxP3+, CD25high+) est augmenté dans le sang périphérique des patients HTAP, similairement à certains cancers (Wolf *et al.*, 2003), alors que le taux de lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) est diminué (Ulrich *et al.*, 2008a). Cependant dans une étude plus récente, le nombre de lymphocytes T régulateurs circulants n'est pas différent entre patients HTAP et contrôles, mais il semblerait que leur fonction soit activée, notamment par une augmentation du taux de leptine circulante et une augmentation de l'expression des récepteurs à la leptine sur les lymphocytes T régulateurs (Huertas *et al.*, 2012). De plus, dans d'autres études sur les poumons de patients HTAPi, il a été observé une augmentation du nombre de lymphocytes T cytotoxiques effecteurs (CD8+) et helper (CD4+) associée à une augmentation du nombre de lymphocytes T régulateurs (CD4+, FoxP3+, CD25high+) (Austin *et al.*, 2010; Savai *et al.*, 2012). Ainsi, bien que l'impact exact des lymphocytes T reste encore à éclaircir, il semble que le nombre, ou du moins l'activité, des lymphocytes T régulateurs soit augmenté dans l'HTAP, élément certainement impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP via leur rôle dans le contrôle de l'activité des lymphocytes T effecteurs, des lymphocytes B et des cellules dendritiques (Perros *et al.*, 2008a; Tamosiuniene *et al.*, 2011).

2.3.3 Production d'auto-anticorps

Probablement en lien avec un dysfonctionnement au niveau des lymphocytes B producteurs d'anticorps et des lymphocytes T régulateurs contrôlant la « tolérance au soi » et donc l'auto-immunité, il a été observé une augmentation du taux d'auto-anticorps dirigés contre les composants de la paroi vasculaire dans l'HTAP (Mouthon *et al.*, 2005; Nicolls *et al.*, 2005; Rich *et al.*, 1986). Ces auto-anticorps (non-spécifiques) dirigés contre les CE (Dib *et al.*, 2012; Tamby *et al.*, 2005) et les fibroblastes (Tamby *et al.*, 2006; Terrier *et al.*, 2008) retrouvés chez des patients atteints d'HTAP idiopathique et associée à une sclérodémie systémique pourraient avoir un rôle dans l'adhésion des

leucocytes aux CE vasculaires (Carvalho *et al.*, 1996), dans l'apoptose précoce des CE (Bordron *et al.*, 1998) ainsi que dans l'activation des fibroblastes en phénotype pro-inflammatoire (Chizzolini *et al.*, 2002). Ces auto-anticorps pourraient être produits au sein de tissus lymphoïdes tertiaires contenant des lymphocytes B et T nouvellement formés autour des vaisseaux pulmonaires remodelés des patients HTAPi (Perros *et al.*, 2012).

2.4 Anomalies morphologiques

2.4.1 Néo-intima

La néo-intima est une composante vasculaire supplémentaire entre l'endothélium et la limitante élastique interne, constituée de myofibroblastes, de composants de la matrice extracellulaire et d'infiltrats inflammatoires (Humbert *et al.*, 2004b; Jones *et al.*, 1997). Ainsi cette couche vasculaire additionnelle favorise l'occlusion des petites artères pulmonaires notamment en induisant la prolifération des CML-AP de la média adjacente (Ostriker *et al.*, 2014) et contribue à la formation des lésions complexes endoluminales (Toba *et al.*, 2014). Elle pourrait avoir pour origine les fibroblastes adventitiels activés précocement (Stenmark *et al.*, 2002).

2.4.2 Lésions fibrosantes intimales

Des lésions fibrosantes composées majoritairement de fibroblastes participent au rétrécissement de la lumière des artérioles pulmonaires. Il a été décrit dans l'HTAP deux types de lésions fibrosantes se différenciant par leur état de stratification: la fibrose intimale concentrique stratifiée, qualifiée de « bulbes d'oignons » et la fibrose intimale excentrique non stratifiée (Pietra *et al.*, 2004; Pietra *et al.*, 1989).

2.4.3 Lésions thrombotiques *in situ*

Des lésions thrombotiques sont souvent observées dans la lumière des artérioles pulmonaires au cours de l'HTAP, composées d'un thrombus parfois re-canalisé (Fuster *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 2006a; Pietra *et al.*, 1989). Ces lésions sont le reflet d'une altération de la coagulation dans l'HTAP (Lannan *et al.*, 2014). En effet, il a été observé une augmentation de l'activité de la thrombine (Eisenberg *et al.*, 1990; Tournier *et al.*, 2010), une augmentation de l'activation des plaquettes (Herve *et al.*, 2001; Varol

et al., 2011), une augmentation de l'expression du facteur tissulaire (exerçant un rôle initiateur dans la cascade de coagulation), au niveau des lésions vasculaires (White *et al.*, 2007) et sur des microparticules de CE circulantes (Bakouboula *et al.*, 2008), ainsi qu'une déficience de certains effecteurs des voies anticoagulantes comme l'anti-thrombine et la thrombomoduline (Sakamaki *et al.*, 2000; Welsh *et al.*, 1996). En outre, la dysfonction endothéliale favorise la formation de thrombus puisqu'elle entraîne des modifications des fonctions hémostatiques de l'endothélium vasculaire pulmonaire, liées à une dérégulation de la balance thrombomoduline/facteur tissulaire exprimés à sa surface, à une fibrinolyse inefficace et à une activation et agrégation plaquettaire favorisée par une diminution de la production de NO et de prostacyclines (Chaouat *et al.*, 1996; Kopec *et al.*, 2013). De plus, le nombre de microparticules circulantes issues des plaquettes et issues des CE est augmenté chez les patients HTAP (Amabile *et al.*, 2013; Nadaud *et al.*, 2013). Ces microparticules, en particulier celles issues des plaquettes, étant bien plus pro-coagulantes que leurs cellules d'origines de part la présence de phosphatidylsérines à leur surface, entretiennent ainsi un état d'hyper-coagulation (Sinauridze *et al.*, 2007).

2.4.4 Lésions plexiformes

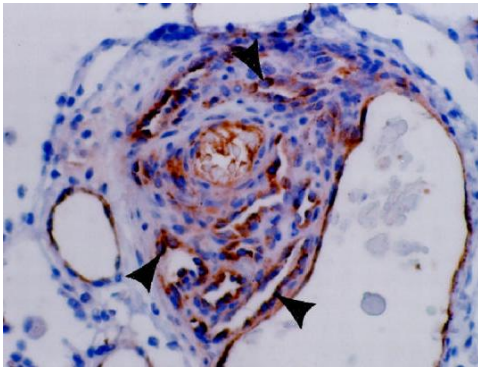


Figure 6: Illustration de lésions plexiformes chez un patient HTAPi. Les CE constitutives des lésions plexiformes sont indiquées par les flèches. Source: (Cool *et al.*, 1999)

Les lésions plexiformes sont des anomalies complexes souvent observées dans l'HTAP à des stades avancés, composées de CE soutenues par un stroma contenant des protéines de matrice et des myofibroblastes, formant des canaux endoluminaux obstruant le lit des petites artères lobulaires, localisées en particulier au niveau des ramifications artérielles et des artères supra-numéraires (Figure

6: Illustration de lésions plexiformes chez un patient HTAPI) (Bjornsson *et al.*, 1985; Pietra *et al.*, 2004; Pietra *et al.*, 1989). La formation de ces lésions est la conséquence de la dysfonction endothéliale dont le stimulus initiateur reste incertain mais qui pourrait impliquer l'hypoxie alvéolaire, l'inflammation, le shear stress et/ou la réponse à une drogue ou à un agent infectieux, sur fond de susceptibilité génétique. Il semble que les CE hyper-proliférantes et résistantes à l'apoptose constituant les lésions plexiformes soient issues d'une sélection monoclonale (Lee *et al.*, 1998) après une probable phase initiatrice d'apoptose des CE de l'endothélium vasculaire pulmonaire et qu'une partie de ces CE soient issues de cellules progénitrices endothéliales circulantes qui se sont accumulées et ont proliféré aux niveaux des vaisseaux pulmonaires présentant un endothélium dénudé ou altéré (Masri *et al.*, 2007; Sakao *et al.*, 2009; Yeager *et al.*, 2001). De plus, il a été constaté une augmentation de l'expression de HIF1 α (Hypoxia inducible factor 1 α), de VEGF (Vascular endothelial growth factor) et de ces récepteurs dans les CE des lésions plexiformes (Bockmeyer *et al.*, 2012; Cool *et al.*, 1999; Hirose *et al.*, 2000; Jonigk *et al.*, 2011; Tuder *et al.*, 2001).

2.4.5 Accumulation de matrice extracellulaire

Une accumulation excessive et progressive de composantes de la matrice extracellulaire, telles que le collagène, l'élastine, la fibronectine et la ténascine C, est observée au niveau de l'adventice des vaisseaux pulmonaires remodelés (Durmowicz *et al.*, 1994; Ihida-Stansbury *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 1997). L'accumulation de collagène a très probablement un effet sur la rigidité de la paroi artérielle et par conséquent sur le débit sanguin dans l'artère. La fibronectine et la ténascine C quant à elles facilitent la prolifération et la différenciation en myofibroblastes des fibroblastes adventitiels. De plus, l'expression et l'activité des métalloprotéases (MMP), en particulier MMP-2 et -9, qui sont des enzymes qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire, sont augmentées dans l'HTAP (Benisty *et al.*, 2005; Lepetit *et al.*, 2005). La dégradation du collagène de la membrane basale, du collagène interstitiel, de la fibronectine et de divers protéoglycanes par ces MMP permet la migration des fibroblastes et myofibroblastes adventitiels vers la média, la néo-intima et les lésions fibrosantes et plexiformes dans la lumière des vaisseaux. L'activité de ces MMP favorise également la prolifération

et la migration des CML-AP sous-jacentes ainsi que l'infiltration de cellules inflammatoires, participant ainsi au remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTAP (Chelladurai *et al.*, 2012).

3 Traitements de l'HTAP

Similairement à la classification des hypertensions pulmonaires, les algorithmes de prise en charge des patients HTAP sont régulièrement revus et corrigés lors des symposiums mondiaux en fonction des avancées concernant la compréhension de la maladie et les traitements identifiés. Le dernier en date (en 2013 à Nice) propose un nouvel algorithme de traitement présenté dans la figure ci-dessous (Figure 7: Algorithme des traitements de l'HTAP). Les grades et les niveaux de preuve des recommandations sont définis dans les tableaux 3 et 4.

Avant tout, en vue d'une prise en charge globale la plus efficace possible pour le patient atteint d'HTAP, il est recommandé que le suivi du patient soit réalisé dans des centres spécialisés pour l'HTAP constitués d'équipes soignantes qui connaissent parfaitement la pathologie.

Grade	Définition	Application
Grade I	Evidence et/ou consensus qu'un traitement ou une procédure est bénéfique, utile et efficace.	Est recommandé et indiqué
Grade II	Preuves contradictoires et/ou divergences d'opinions à propos de l'efficacité et de l'utilité d'un traitement ou d'une procédure.	
- Grade IIa	Preuves ou opinions majoritairement en faveur de l'efficacité et de l'utilité.	Est à considérer
- Grade IIb	L'efficacité et l'utilité sont moins bien établies.	Peut être considéré
Grade III	Evidence et/ou consensus qu'un traitement ou une procédure n'est pas utile ou efficace et qu'ils peuvent être néfastes dans certains cas.	N'est pas recommandé

Tableau 3: Définition et application des grades des recommandations.

Niveau de preuve	Définition
Niveau A	Les données sont issues de plusieurs études cliniques randomisées ou de méta-analyses.
Niveau B	Les données sont issues d'une seule étude clinique randomisée ou de larges études non-randomisées.
Niveau C	Consensus d'opinions d'experts et/ou les données sont issues de petites études, d'études rétrospectives et/ou de registres.

Tableau 4: Définition des niveaux de preuve des recommandations.

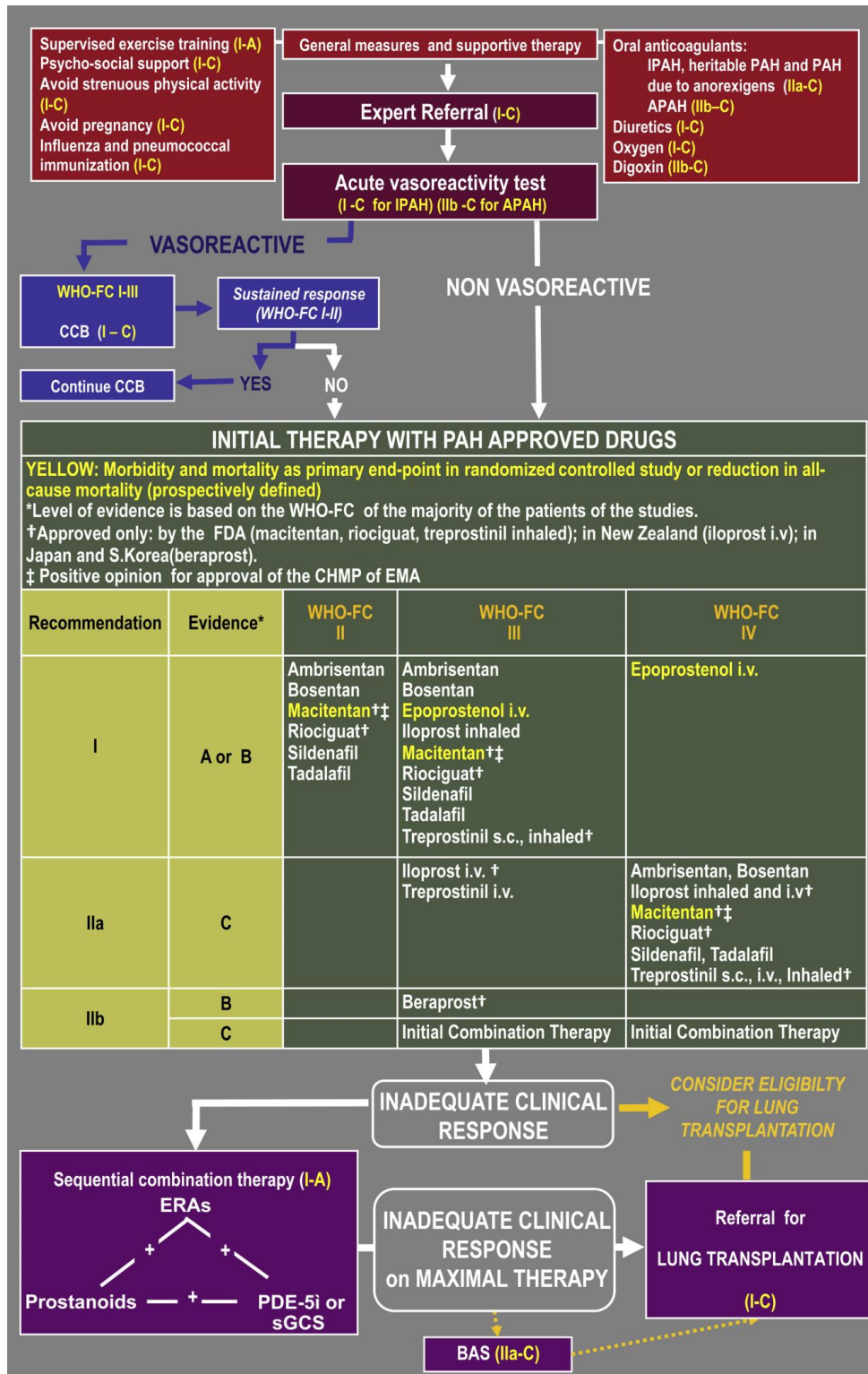


Figure 7: Algorithme des traitements de l’HTAP. Source: (Galie *et al.*, 2013)
 APAH = associated pulmonary arterial hypertension; BAS = balloon atrial septostomy; CCB = calcium channel blockers; ERA = endothelin receptor antagonist; sGCS = soluble guanylate cyclase stimulators; IPAH = idiopathic pulmonary arterial hypertension; i.v. = intravenous; PDE-5i = phosphodiesterase type-5 inhibitor; s.c. = subcutaneous; WHO-FC = World Health Organization functional class.

3.1 Traitements non spécifiques

3.1.1 Diurétiques

La prescription de diurétiques est recommandée dans l'HTAP puisqu'elle contrecarre l'hyper-volémie et ses symptômes associés causés par l'insuffisance cardiaque. Le choix du diurétique et de sa dose est à définir par le médecin référent en fonction des paramètres cliniques et hémodynamiques. La fonction rénale doit être surveillée régulièrement, associé à des bilans biologiques sanguins pour éviter une hypokaliémie.

3.1.2 Anticoagulants oraux

Au vu des lésions vasculaires thrombotiques observées dans l'HTAP associées au facteur de risque pro-thrombotique que représente l'insuffisance cardiaque, le concept d'une anti-coagulation orale peut avoir des effets bénéfiques dans l'HTAP. Confirmant cette hypothèse, certaines études (bien que peu nombreuses) ont montré une amélioration de la survie de patients HTAP recevant des anticoagulants (Johnson *et al.*, 2006b; Olsson *et al.*, 2014). Ainsi, il est recommandé de prescrire des anticoagulants oraux comme les anti-vitamine K (la warfarine par exemple) chez les patients HTAP, en absence de contre-indication. Un contrôle régulier de l'efficacité du traitement anticoagulant par mesure de l'INR (International Normalized Ratio) doit être effectué avec pour objectif un INR compris entre 1.5 et 2.5.

3.1.3 Oxygène

Une oxygénothérapie est recommandée chez les patients dont la pression partielle d'oxygène (pO_2) est inférieure à 8kPa (60mmHg) pendant au moins 15h/jour. Chez les patients avec une faible pO_2 et/ou chez les patients séjournant en altitude ou en avion, l'objectif de l'oxygénothérapie est d'atteindre une saturation en O_2 supérieure à 92%.

3.1.4 Antagonistes calciques

Au moment du diagnostic de l'HTAP (lors du cathétérisme cardiaque droit), la réponse aiguë à des vasodilatateurs est testée avec du NO inhalé (ou de l'époprosténol iv ou de l'adénosine iv), car les patients répondeurs sont susceptibles de mieux répondre aux antagonistes calciques, associé à une amélioration de leur survie (Rich *et al.*, 1992; Sitbon *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2012). Ainsi leur

prescription (diltiazem, nifédipine ou amlodipine) est recommandée chez ces patients. L'objectif thérapeutique est une amélioration de la classe fonctionnelle NYHA (c'est à dire passer à une classe NYHA I ou II). Si tel n'est pas le cas au bout de 3-4 mois de traitement par un antagoniste calcique, le patient est considéré comme non répondeur et une autre thérapie devra être envisagée (à choisir parmi les traitements spécifiques de l'HTAP).

3.2 Traitements pharmacologiques spécifiques de l'HTAP

Basées sur une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie, des thérapies ciblant les altérations de la voie de l'endothéline (antagonistes des récepteurs à l'endothéline), de la voie du NO (inhibiteurs de la PDE5) et de la voie des prostacyclines sont actuellement utilisées en clinique (Figure 8: Thérapies ciblées de l'HTAP). Ces médicaments prescrits seuls ou en association ont prouvé leur efficacité dans des études cliniques randomisées contrôlées contre placebo.

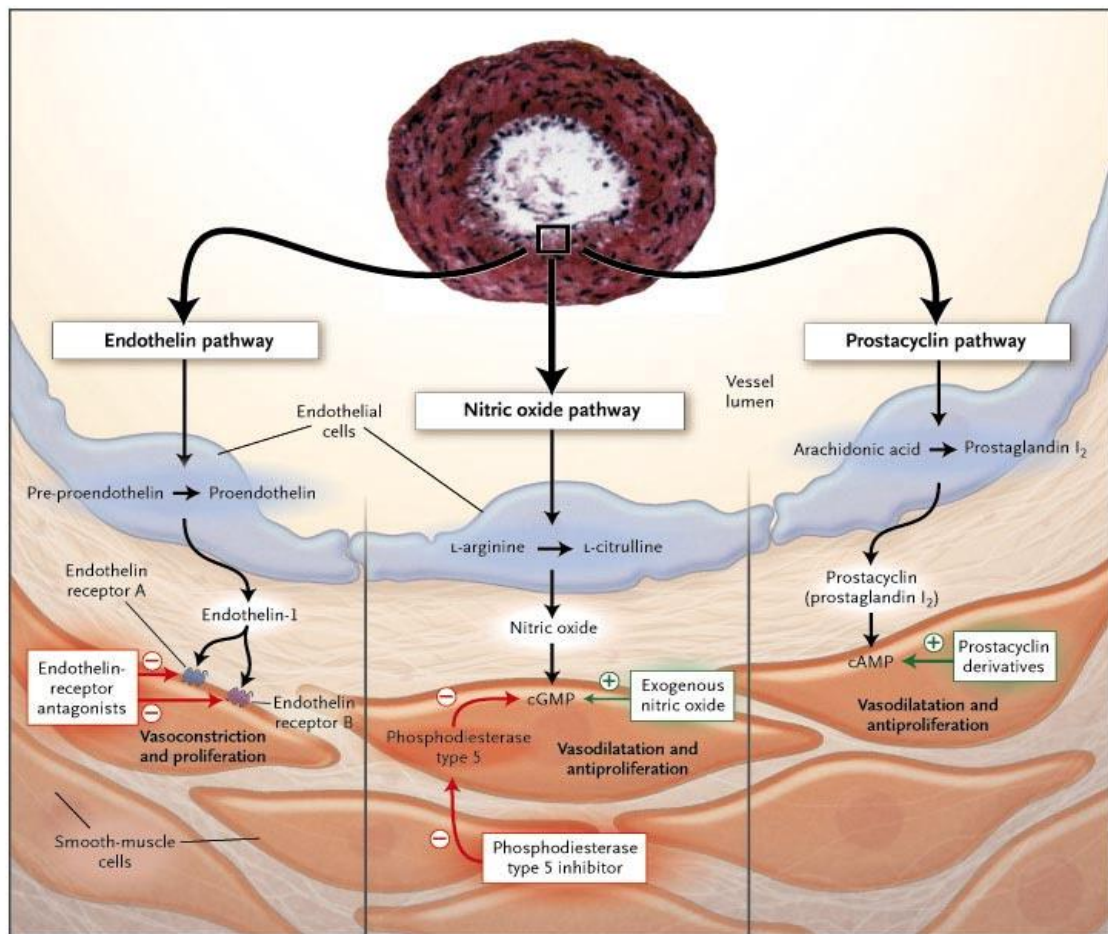


Figure 8: Thérapies ciblées de l'HTAP. Source: (Humbert *et al.*, 2004c)

3.2.1 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline

La voie de l'endothéline est suractivée chez les patients HTAP (Giaid *et al.*, 1993). Les effets vasoconstricteurs et pro-prolifératifs de l'endothéline passant par les récepteurs ET-A et ET-B sur les CML-AP, cibler ces récepteurs par des antagonistes pharmacologiques s'avère efficace en clinique (Liu *et al.*, 2013). Ainsi trois médicaments administrés par voie orale sont actuellement sur le marché et recommandés pour le traitement de patients HTAP de classe fonctionnelle NYHA II ou III: le bosentan, le macitentan et l'ambrisentan.

Le bosentan (Tracleer®) est un antagoniste compétitif non spécifique des récepteurs ET-A et ET-B qui a prouvé son efficacité dans cinq études cliniques, dont BREATHE et EARLY (Channick *et al.*, 2001; Galie *et al.*, 2008b; Rubin *et al.*, 2002). Bien qu'il soit globalement bien toléré, le bosentan est associé à des effets indésirables hépatiques (Humbert *et al.*, 2007).

Le macitentan (Opsumit®) est un antagoniste des récepteurs ET-A et ET-B, développé récemment en modifiant la structure du bosentan pour augmenter son efficacité et sa sécurité (Iglarz *et al.*, 2014), ce qui est effectivement le cas en l'absence de toxicité hépatique avec le macitentan. Basé sur les résultats de l'étude clinique SERAPHIN (Pulido *et al.*, 2013), le macitentan a reçu son autorisation de mise sur le marché en 2013.

L'ambrisentan (Volibris®) est un antagoniste spécifique du récepteur ET-A qui a prouvé son efficacité dans deux études cliniques (études ARIES-1 et -2) (Galie *et al.*, 2008a). Bien qu'aucune différence clinique n'ait été relevée entre les antagonistes non spécifiques et les antagonistes spécifiques des récepteurs à l'ET-1 (notamment en l'absence de larges études cliniques randomisées les comparant), il semble que l'antagoniste spécifique ambrisentan soit associé à moins d'effets indésirables hépatiques que le bosentan. Ainsi il n'est pas nécessaire de réaliser un suivi hépatique mensuel avec l'ambrisentan et la prescription de ce médicament est donc plus pertinente pour les patients ayant des problèmes hépatiques associés ou si la prise d'autres médicaments métabolisés par le foie est envisagée (Ben-Yehuda *et al.*, 2012; McGoan *et al.*, 2009).

3.2.2 Les inhibiteurs de la PDE5

Nous avons vu précédemment que l'altération de la voie du NO dans l'HTAP passe notamment par une augmentation des enzymes PDE (dont l'isoforme PDE-5) dégradant le second messenger GMPc (Murray *et al.*, 2002). Cibler cette altération avec des inhibiteurs de la PDE-5 permet de restaurer les taux de GMPc et ainsi de réactiver la voie du NO endogène à l'origine d'effets vasodilatateurs et anti-prolifératifs bénéfiques (Francis *et al.*, 2010; Napoli *et al.*, 2003; Tantini *et al.*, 2005; Wharton *et al.*, 2005). Deux molécules administrées par voie orale également utilisées dans le traitement de la dysfonction érectile pour leurs effets vasodilatateurs sont actuellement sur le marché et recommandées dans le traitement des HTAP de classes NYHA II et III: le sildénafil (Revatio®: études cliniques SUPER-1 et PACES (Galie *et al.*, 2005)) et le tadalafil (Adcirca®: études cliniques PHIRST et PHIRST-2 (Galie *et al.*, 2009; Oudiz *et al.*, 2012)). Elles présentent des effets indésirables similaires, liés à leurs effets vasodilatateurs au niveau systémique (mal de tête, flushing, épistaxis...).

Le riociguat est une nouvelle molécule qui vise à augmenter le taux de GMPc en activant la guanylate cyclase soluble. Elle est actuellement en cours d'études cliniques de phase 3 (études CHEST-1 et PATENT-1) et de procédure de mise sur le marché (Archer, 2013; Ghofrani *et al.*, 2013; Huh *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2012).

3.2.3 Les analogues de prostacyclines

Une diminution de la synthèse endothéliale des prostacyclines endogènes étant une des caractéristiques de la physiopathologie de l'HTAP (Tuder *et al.*, 1999), administrer des analogues de prostacyclines exogènes permet de réactiver cette voie aux propriétés vasodilatatrices et antiprolifératives (Galie *et al.*, 2003). Trois molécules sont actuellement sur le marché et recommandées dans le traitement des HTAP de classes NYHA III et IV: l'époprosténol, l'iloprost, le treprostinil.

L'époprosténol (Flolan®) est le premier médicament à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'HTAP en 1995 au vu des preuves d'efficacité apportées par trois études cliniques (Badesch *et al.*, 2000; Barst *et al.*, 1996; Rubin *et al.*, 1990). Cependant son administration

par perfusion iv cathétérisée centralisée dont le réservoir doit être changé toutes les 8 à 12 heures est très contraignante et peut engendrer de effets indésirables graves et de sérieuses complications (sepsis, thrombose, pneumothorax...) liés à une infection ou à une obstruction du cathéter, limitant par conséquent son utilisation principalement aux patients HTAP très sévères de classe NYHA IV.

L'iloprost (Ventavis®) est un analogue de prostacyclines disponible par voie inhalée qui a prouvé son efficacité clinique dans l'étude AIR (Olschewski *et al.*, 2002). L'iloprost est mieux toléré que l'époprosténol, cependant l'emploi du dispositif d'inhalation n'est pas des plus aisé, associé à des « gaps thérapeutiques » entre les prises. L'iloprost est donc à utiliser avec précaution en associant une éducation thérapeutique du patient afin de maximiser son observance au traitement; il est souvent prescrit en seconde ligne thérapeutique et/ou dans le cadre d'une combinaison thérapeutique séquentielle.

Le treprostinil est un analogue de l'époprosténol qui a été développé pour faciliter son administration. Ainsi le treprostinil est disponible en micro-perfusion sous-cutanée (Remodulin®: une étude clinique (Simonneau *et al.*, 2002)), en perfusion iv (Remodulin®: étude clinique TRUST (Hiremath *et al.*, 2010)), par voie inhalée (Tyvaso®: étude clinique TRIUMPH en association au bosentan ou au sildénafil (McLaughlin *et al.*, 2010)) ou par voie orale (études cliniques FREEDOM-C1 (associé au bosentan),-C2 (associé au sildénafil),-M (en monothérapie) (Jing *et al.*, 2013; Tapson *et al.*, 2013; Tapson *et al.*, 2012)).

Une nouvelle molécule ciblant la voie des prostacyclines est en cours d'étude clinique de phase 3 (étude GRIPHON): le selexipag, un agoniste des récepteurs à la PGI₂, dont la prise par voie orale est plus sécurisante et moins contraignante que les précédents produits.

3.2.4 Les thérapies combinées

Combiner plusieurs médicaments pour cibler plusieurs voies pathobiologiquement altérées dans l'HTAP est une idée séduisante (Channick, 2013). A l'heure actuelle, il est recommandé d'effectuer une combinaison séquentielle de deux ou trois molécules, en cas de résultats cliniques de la monothérapie initiale inadéquats ou en cas de détérioration de l'état clinique du patient. Ainsi des

méta-analyses des études évaluant l'association de plusieurs médicaments dans l'HTAP révèlent que les thérapies combinées augmentent significativement la distance du test de marche et réduisent le risque d'aggravation clinique (Bai *et al.*, 2011; Coeytaux *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2011; Galie *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012). Il peut être combiné un antagoniste des récepteurs à l'endothéline avec un inhibiteur de PDE5 ou avec un analogue des prostacyclines ou bien un inhibiteur de PDE5 avec un analogue des prostacyclines.

La prescription simultanée de plusieurs médicaments dans la prise en charge initiale du patient a été étudiée dans certaines études cliniques randomisées contrôlées (études BREATHE-2, AMBITION et ATPAHSS) (Humbert *et al.*, 2004a; Kemp *et al.*, 2012) et est recommandée pour des patients HTAP très sévères de classe NYHA IV, sans que le choix des molécules à associer ne soit pour l'heure clairement établi. Dans tous les cas et faute de mieux, les thérapies combinées sont largement employées en pratique clinique chez les patients instables.

3.3 Traitements interventionnels

En cas d'échec des traitements pharmacologiques, les traitements interventionnels doivent être rapidement envisagés: la transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire, l'atrioseptostomie, la procédure de Potts ou l'endartériectomie. Ces interventions doivent être réalisées dans des centres expérimentés spécialisés afin de maximiser les chances de réussite (Keogh *et al.*, 2009).

En fonction de l'atteinte cardiaque et de la disponibilité des greffons, une transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire sera préférée. Ainsi, la transplantation pulmonaire dite bilatérale est choisie pour les HTAP idiopathiques ou secondaires, en espérant que la fonction du ventricule droit se normalise rapidement grâce au « remodelage cardiaque bénéfique » (capacité du cœur à récupérer). Alors que pour les patients avec des anomalies congénitales cardiaques (en particulier le syndrome d'Eisenmenger), des insuffisances cardiaques droites et/ou gauches avec une hypertrophie cardiaque importante, et une souffrance viscérale associée (ascite, insuffisance hépatique...), la transplantation cardio-pulmonaire est la procédure de choix. Bien que nécessaire, la transplantation est une opération très lourde, parfois mortelle, et pour laquelle le suivi et le quotidien du patient greffé sont très

contraignants. Néanmoins le taux de survie à 5 ans s'améliore passant de 50% à 75% dans certaines études (Toyoda *et al.*, 2008; Trulock *et al.*, 2006).

L'atrioseptostomie est indiquée chez les patients en insuffisance cardiaque et peut être proposée en attendant une transplantation ou dans des centres chirurgicaux ne disposant pas de greffons pulmonaires. Le principe de l'atrioseptostomie se base sur l'observation que les patients HTAP avec un syndrome d'Eisenmenger associé ont un meilleur pronostic que les patients HTAPi (Hopkins *et al.*, 1996). Ainsi cette opération réalisée en percutanée consiste en la création d'une ouverture entre les deux oreillettes (sorte de shunt gauche-droit) à l'aide du gonflement d'un ballonnet qui peut être associée à la mise en place d'un stent. Elle permet alors de diminuer la précharge du ventricule droit, d'améliorer le débit cardiaque et de réduire la sur-réactivité sympathique (Bhamra-Ariza *et al.*, 2014). Cependant cette opération est associée à une importante désaturation et à une mortalité immédiate de 16% (Sandoval *et al.*, 2001), son indication est donc limitée et très encadrée (Keogh *et al.*, 2009).

La procédure de Potts est une nouvelle alternative à l'atrioseptostomie pour diminuer la précharge du ventricule droit qui consiste à créer une anastomose directe entre l'aorte thoracique descendante et l'artère pulmonaire gauche avec un moindre risque de désaturation potentielle (Bhamra-Ariza *et al.*, 2014). Pour l'instant cette technique n'a été testée que sur quelques petites séries de patients, en l'occurrence des enfants de moins de 15 ans de classes NYHA IV avec des taux de succès de 50 à 75% (Baruteau *et al.*, 2012) et n'est pas encore référencée dans les recommandations internationales.

Au contraire des trois précédentes opérations, l'endartériectomie est le seul traitement chirurgical qui peut entraîner une guérison de l'hypertension pulmonaire d'origine thromboembolique (CTEPH). En effet, cette opération qui consiste à désobstruer les artères pulmonaires des caillots thrombotiques fibrotiques bouchant les artères de façon « mécanique » est le traitement de choix pour la CTEPH (Dartevelle *et al.*, 2004).

Chapitre 2: Phénotype pseudo-tumoral dans l'HTAP

Le concept de phénotype appelé « pseudo-tumoral » dans l'HTAP a émergé ces dernières années dans la physiopathologie de l'HTAP suite à la constatation d'une analogie entre certaines altérations observées dans l'HTAP et dans le cancer (Adnot *et al.*, 2007; Guignabert *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2008; Sakao *et al.*, 2011). Le préfixe « pseudo » fait allusion au fait que toutes les caractéristiques du cancer ne sont tout de même pas retrouvées dans l'HTAP et que, par conséquent, cette similitude reste incomplète. Néanmoins les différentes caractéristiques de l'HTAP décrites dans ce chapitre représentent de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pour lesquelles l'utilisation de médicaments anti-cancéreux, dont certains sont d'ores et déjà à l'étude, pourrait être bénéfique dans le traitement de l'HTAP.

Dans ce chapitre, le concept de phénotype pseudo-tumoral observé dans l'HTAP est décrit en se basant sur les caractéristiques du cancer décrites par Hanahan et Weinberg en 2000 (Hanahan *et al.*, 2000) et réactualisées en 2011 (Hanahan *et al.*, 2011), qui, même si elles sont encore débattues sur certains aspects (Sonnenschein *et al.*, 2013), permettent de s'en faire une vision globale et détaillée (Figure 9: Caractéristiques communes entre HTAP et cancer).

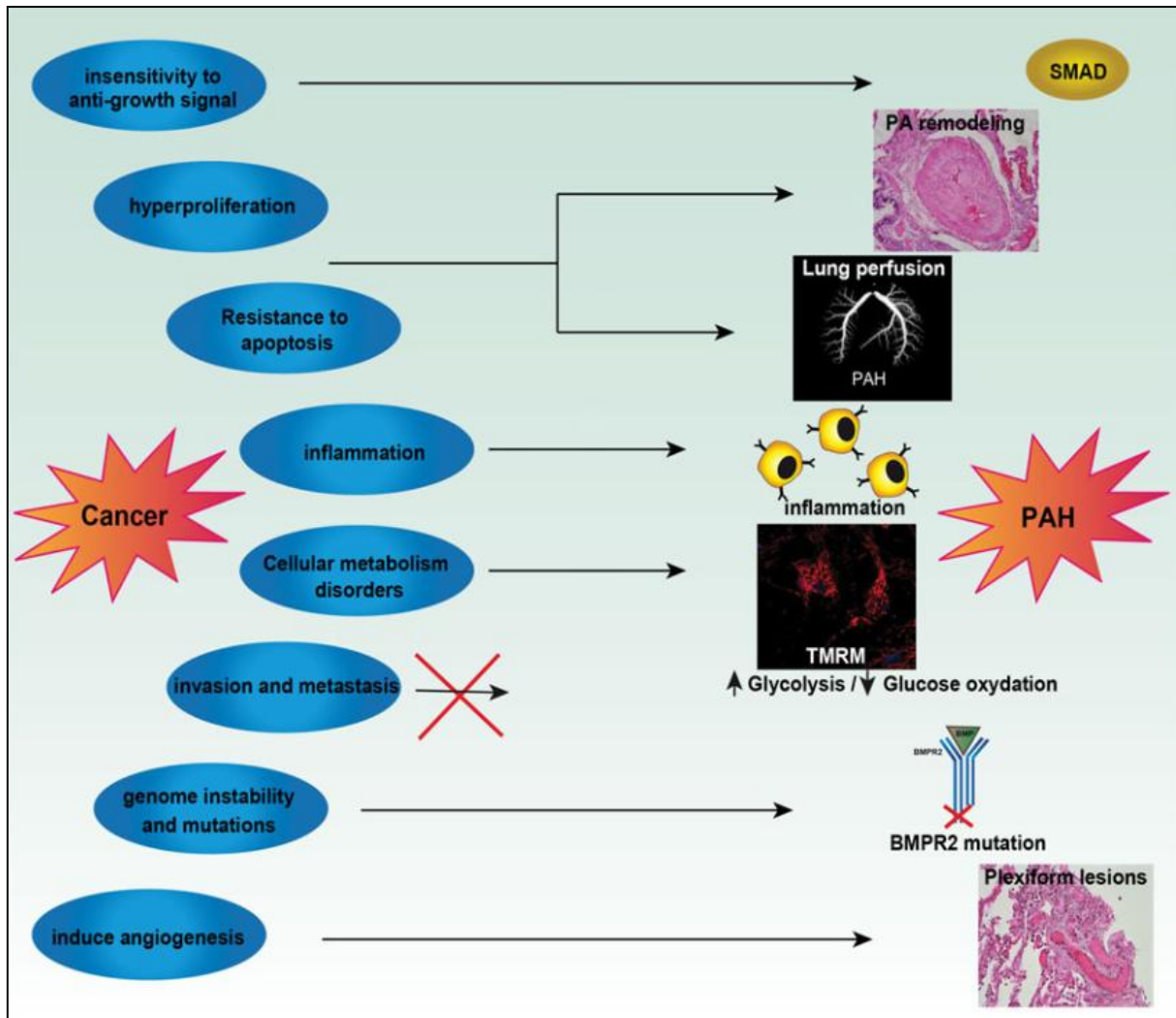


Figure 9: Caractéristiques communes entre HTAP et cancer. Source: (Paulin *et al.*, 2011a)

1 Génération intrinsèque de signaux de croissance

Les cellules normales sont dépendantes de facteurs de croissance pour passer de la phase de quiescence cellulaire à la mitose, alors que les cellules tumorales ont la capacité de diminuer voire d'abolir cette dépendance aux facteurs de croissance, notamment par génération de leurs propres facteurs de croissance associée à une stimulation autocrine et paracrine. Cette caractéristique est retrouvée dans l'HTAP où l'expression et la libération de facteurs mitogènes, comme le PDGF (Perros *et al.*, 2008b), est augmentée dans les poumons de patients HTAP par rapport aux poumons de patients contrôles. Les CML-AP et les CE-AP issues de poumons de patients HTAP présentent alors une activité proliférative anormalement élevée en réponse à divers stimuli (5-HT, ET-1, PDGF, EGF (Epidermal Growth factor), FGF-2 (Fibroblast growth factor 2)...) par rapport à des cellules de

Introduction : Phénotype pseudo-tumoral dans l'HTAP

patients contrôles (Csiszar *et al.*, 2009; Mandegar *et al.*, 2004). Cette caractéristique observée en culture cellulaire, soit en dehors de leur environnement tissulaire *in vivo*, est notamment due à une surexpression des éléments de transduction de ces facteurs (transporteurs 5-HTT, récepteurs ETA...) (Adnot, 2005; Davie *et al.*, 2002; Eddahibi *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2011; Tu *et al.*, 2011).

Par conséquent, dans l'HTAP, similairement au processus tumoral, intervient une altération dans le dialogue inter-cellulaire au sein des vaisseaux pulmonaires, notamment entre CML-AP et les CE-AP avec une libération excessive de facteurs de croissance (FGF-2, Ang II, ET-1, 5-HT) et de cytokines (IL-6, MCP-1) par les CE-AP exerçant une stimulation paracrine sur les CML-AP (de Man *et al.*, 2012; Eddahibi *et al.*, 2006; Frascch *et al.*, 1999; Giaid *et al.*, 1993; Izikki *et al.*, 2009; Marcos *et al.*, 2004; Savale *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2011). De même, l'expression du PDGF-A et -B et de ces récepteurs α et β est augmentée dans les poumons de patients HTAP (CE-AP, CML-AP et cellules inflammatoires) en comparaison à des poumons de patients contrôles (Perros *et al.*, 2008b; Schermuly *et al.*, 2005), le PDGF étant un puissant mitogène des CML-AP. De façon intéressante, il a même été montré que l'anticancéreux imatinib, un antagoniste des récepteurs du PDGF, réverse le remodelage vasculaire pulmonaire dans le modèle expérimentale d'HTAP induite par la monocrotaline (MCT) chez le rat (Schermuly *et al.*, 2005). Cette molécule est actuellement à phase d'étude clinique (étude IMPRES) dans le cadre de thérapies combinées. Les plaquettes participent également à la création du remodelage vasculaire pulmonaire par la libération massive de facteurs comme le PDGF, le thromboxane A2 et la 5-HT qui agissent sur la prolifération et la migration des CML-AP et des fibroblastes (Berger *et al.*, 2009).

Dans l'HTAP, comme dans le cancer, certaines voies de signalisation intracellulaire sont altérées en mode « constitutivement activée » conduisant à une hyper-prolifération cellulaire. Par exemple, l'expression et l'activité de la protéine p130^{cas}, un amplificateur du signal transduit par les facteurs de croissance EGF, FGF-2, PDGF, sont augmentées dans le sérum, les poumons et les cellules vasculaires pulmonaires de patients HTAP (Tu *et al.*, 2012).

La voie Notch, impliquée dans la prolifération et la survie des CML vasculaires (Sweeney *et al.*, 2004), semble également être constitutivement activée dans l'HTAP. Cette voie joue un rôle dans plusieurs processus développementaux dont la vasculogénèse embryonnaire et est également une voie oncogénique activée dans plusieurs cancers (Guo *et al.*, 2011; Miele *et al.*, 2006). Dans l'HTAP, une augmentation de l'expression des récepteurs Notch 1, 2, 3 et 4, de leur ligand Jagged1 et de leur effecteur Herp a été observée dans des modèles expérimentaux *in vivo* d'HTAP (Qiao *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2013). Il semble que le récepteur Notch 3 soit particulièrement impliqué dans le développement de l'HTAP puisqu'il est surexprimé dans les poumons de patients et de rongeurs atteints d'HTAP et que des souris KO Notch 3 sont résistantes au développement d'une HTAP sous hypoxie chronique (Geraci *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009).

Similairement au cancer, et peut être en lien avec l'altération de la voie Notch comme décrit dans le cancer de la prostate (Bertrand *et al.*, 2014), la voie oncogénique mTOR (mammalian target of rapamycin) / AKT (serine/threonine protein kinase) est également impliquée dans l'hyper-prolifération des CML-AP HTAP. En effet, il a été observé une augmentation de l'activité de mTOR, en particulier du complexe mTORC2, dans les CML-AP issues de patients HTAPi et de modèles expérimentaux *in vivo* d'HTAP, associée à une augmentation de la phosphorylation de ses substrats comme S6Kinase impliqué la croissance cellulaire (Gary-Bobo *et al.*, 2010; Goncharov *et al.*, 2014; Houssaini *et al.*, 2013). S'en suit une augmentation de la phosphorylation de AKT (par mTORC2 en sérine 473), également induite par PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) (en thréonine 308). De plus, une diminution de l'expression de PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome ten) a été observée dans des modèles expérimentaux d'HTAP, levant son effet inhibiteur sur PI3K (Goncharov *et al.*, 2014; Houssaini *et al.*, 2013; Ravi *et al.*, 2013). AKT ainsi activée phosphoryle à son tour GSK3 (Glycogen synthase kinase-3) (en sérine 9), ce qui a pour effet de l'inactiver. Cette augmentation de la phosphorylation de GSK3 a en effet été retrouvée dans les AP remodelées de patients HTAPi et d'animaux expérimentalement atteints d'HTAP (Houssaini *et al.*, 2013; Krymskaya *et al.*, 2011; Sklepkiwicz *et al.*, 2011). De plus, via d'autres cibles cellulaires de AKT et de mTOR, ces altérations ont potentiellement de multiples conséquences cellulaires, impliquant le métabolisme, l'apoptose, la

prolifération, le cycle cellulaire, la synthèse protéique... (Laplante *et al.*, 2012; Vivanco *et al.*, 2002), contribuant à la mise en place d'un état pro-prolifératif des CML-AP dans l'HTAP.

2 Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance ou anti-prolifératifs

2.1 Mutation du récepteur *BMPR2* - altération de la voie du TGF- β

La voie du TGF- β étant impliquée dans la physiopathologie de certains cancers (Elliott *et al.*, 2005), son altération dans l'HTAP est une des caractéristiques importante du phénotype pseudo-tumoral de l'HTAP. En effet il a été observé une diminution de l'expression du récepteur *BMPR2*, un membre de la famille des récepteurs du TGF- β de type 2 à activité sérine-thréonine kinase, chez les patients HTAP, plus particulièrement marquée chez les patients présentant une mutation sur le gène *BMPR2*. Les mutations sur le gène *BMPR2* peuvent conduire à la formation d'une protéine tronquée dans sa partie C-terminale (à activité sérine-thréonine kinase) ou affecter son domaine de liaison à ses ligands endogènes (principalement BMP 2 et 4), aboutissant ainsi à une perte de fonction de ce récepteur (Atkinson *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2008; De Caestecker *et al.*, 2001; Lane *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2001; Thomson *et al.*, 2000). Il a également été remarqué chez des patients HTAP une diminution de l'expression du récepteur *BMPR1A*, un membre de la famille des récepteurs du TGF- β de type 1 formant des hétérodimères avec les récepteurs de type 2 nécessaires à la transduction du signal (Du *et al.*, 2003). Au niveau intracellulaire, s'en suit alors une altération de la voie SMAD, responsable de la transduction des signaux de la super-famille du TGF- β , caractérisée par une réduction de la phosphorylation de SMAD 1/5/8, avec comme conséquence une suppression de l'activité anti-proliférative de cette voie dans les CML-AP de patients HTAP (Long *et al.*, 2009; Morrell *et al.*, 2001; Morty *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2003). Une dysfonction de la voie SMAD 1/5 a aussi été constatée chez des patients atteints d'HTAPi sans mutation du gène *BMPR2* (Yang *et al.*, 2005a), suggérant que l'altération de la voie SMAD est une caractéristique commune importante au développement de l'HTAP (Richter *et al.*, 2004). De plus, l'altération de la voie BMP/SMAD peut entraîner une activation de la voie oncogénique des MAPKinases (p38MAPK, JNK (Jun N-terminal kinases) et ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases)), qui, en outre, joue un rôle important dans la prolifération exagérée des CML-AP dans l'HTAP (Dewachter *et al.*, 2009;

Moreno-Vinasco *et al.*, 2008; Rudarakanchana *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2005a). Par ailleurs, la forme tronquée du BMPR2 pourrait être à l'origine d'une augmentation de la phosphorylation de Src et donc de son activation exagérée dans l'HTAP, similairement au cancer (Frame, 2002; Wong *et al.*, 2005) Sur la figure 10 sont illustrées les principales voies oncogéniques activées dans la physiopathologie de l'HTAP, dont la voie Src/p38MAPK, les autres voies étant détaillées dans les chapitres suivants.

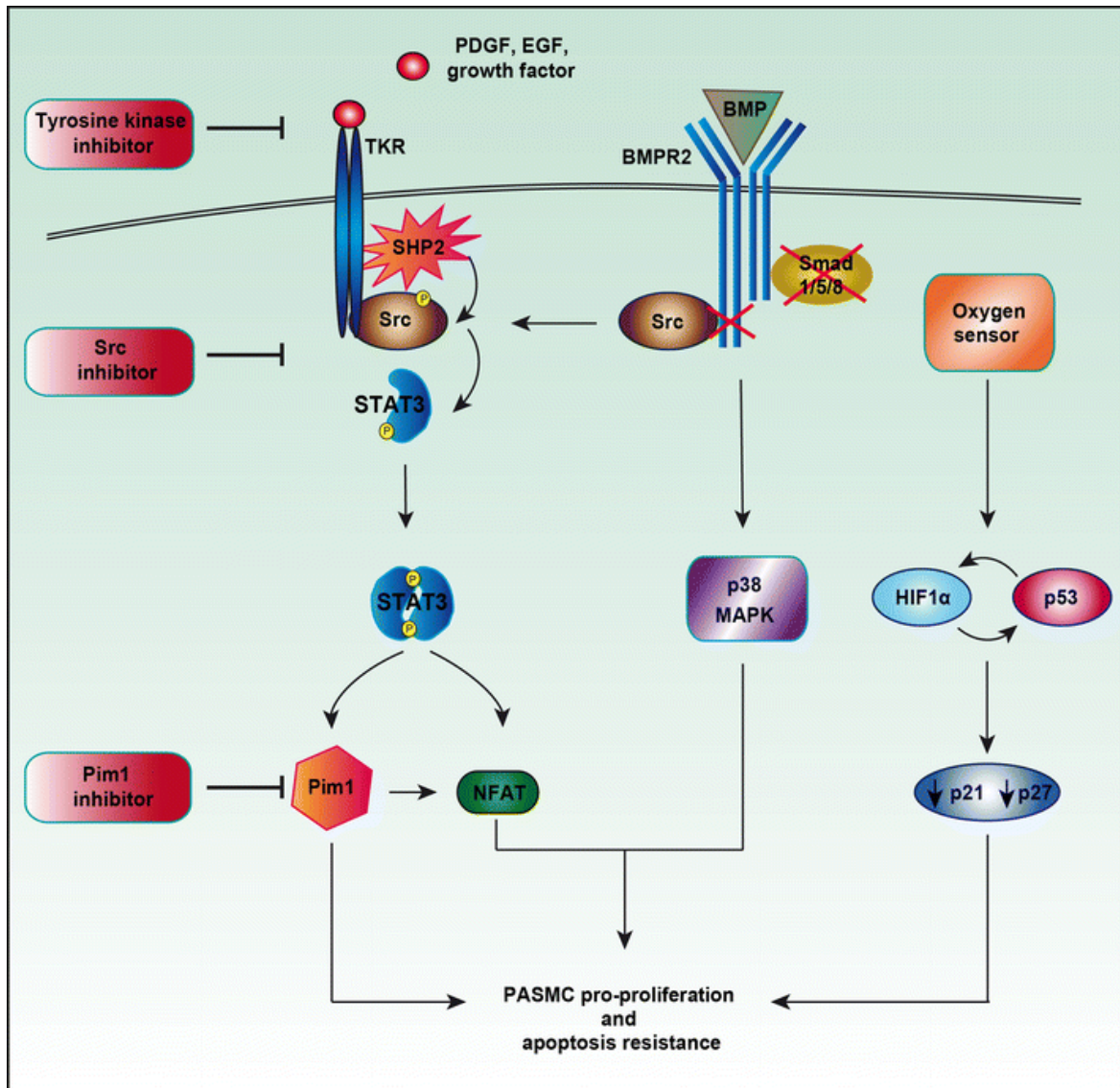


Figure 10: Principales voies oncogéniques activées dans la physiopathologie de l'HTAP.

La stimulation des récepteurs tyrosine kinase (TKR) conduit à l'activation de la voie STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) via la protéine Src, participant à l'hyper-prolifération et à la résistance à l'apoptose des CML-AP dans l'HTAP (via l'activation des protéines Pim1 et NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)). La perte de fonction du récepteur BMPR2 (par mutation) est associée à une altération de la voie Smad 1/5/8 anti-proliférative et une activation des protéines de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) pro-prolifératives. L'activation normoxique de HIF1 α participe également au phénotype pseudo-tumoral dans l'HTAP. Chacune des voies pathologiquement suractivées peuvent être de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes.

Source: (Paulin *et al.*, 2011a).

De façon plus ou moins liée à cette voie des MAPKinases (principalement de ERK1/2), il semble que la voie PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) / ApoE (Apolipoprotein E) soit également impliquée dans les effets antiprolifératifs du BMP. En effet, en tant que cible en aval de la voie du BMPR, il a été observé une diminution de l'expression de PPAR γ dans les poumons de patients HTAP (Ameshima *et al.*, 2003; Hansmann *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2013). Ainsi, l'utilisation d'agoniste de PPAR γ comme le rosiglitazone est une possible intervention thérapeutique qui a d'ores et déjà montré des effets prometteurs en préclinique (Crossno *et al.*, 2007; Hansmann *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

La voie du TGF- β /BMP régulant par ailleurs la transcription de plusieurs micro-ARN, l'altération de cette voie décrite dans l'HTAP pourrait être à l'origine de la dérégulation des miR-21 et miR-143/145 également observée dans l'HTAP mais pour lesquels le rôle exact reste encore à éclaircir (Caruso *et al.*, 2012; Caruso *et al.*, 2010).

2.2 Perte de signaux inhibiteurs de croissance dans les lésions plexiformes

Les lésions plexiformes obstruant les artères pulmonaires sont composées de cellules ayant perdu leur inhibition de contact permettant une hyper-prolifération cellulaire anarchique, similairement aux cellules cancéreuses. En effet, les cellules constitutives de ces lésions sont certainement issues d'une sélection leur conférant des avantages prolifératifs, comprenant notamment: la perte des protéines Smad1/5/8 et PPAR γ anti-prolifératives, une diminution du régulateur du cycle cellulaire p27, une augmentation de l'expression de β -caténine, une diminution d'apeline, la perte de cavéoline-1 et la diminution d'ALCAM-1 (Activated leukocyte cell adhesion molecule 1) et de son partenaire N-cadhérine (Achcar *et al.*, 2006; Alastalo *et al.*, 2011; Cool *et al.*, 1999; Rai *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2004).

3 Résistance à l'apoptose

De manière similaire aux deux précédentes caractéristiques, la résistance à l'apoptose est une des principales caractéristiques communes entre la physiopathologie du cancer et celle de l'HTAP au cours desquelles la balance prolifération/apoptose est dérégulée. En effet, les cellules des AP

remodelées dans l'HTAP sont résistantes à différents stimuli pro-apoptotiques par altération des voies présentées ci-dessous (Masri *et al.*, 2007; Sakao *et al.*, 2009).

3.1 **Sur-expression des protéines anti-apoptotiques**

Similairement au cancer, la survivine, un membre de la famille des inhibiteurs d'apoptose (IAP), est surexprimée dans les AP remodelées de patients HTAP ainsi que dans un modèle expérimentale d'HTAP induite par la MCT, alors qu'elle n'est quasiment pas exprimée dans les AP normales de patients contrôles (McMurtry *et al.*, 2005). La survivine induit alors une résistance à l'apoptose en inhibant la caspase 9 (Mita *et al.*, 2008). Cette observation a conduit à la mise en place d'une étude thérapeutique au cours de laquelle l'administration par voie inhalée d'un mutant dominant négatif de la survivine reverse l'HTAP expérimentale chez les rats MCT, via l'induction d'une apoptose.

Par ailleurs, une augmentation de l'expression de deux protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (B-cell lymphoma 2) a également été observée dans l'HTAP. En effet la protéine BCL-2 est surexprimée dans les poumons de patients HTAPi (Tu *et al.*, 2011) et dans des modèles *in vivo* expérimentaux d'HTAP (Yang *et al.*, 2001), en association à une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale ainsi qu'au maintien du cytochrome c à la mitochondrie, signes d'une résistance à l'apoptose mitochondrie-dépendante (Bonnet *et al.*, 2007). La protéine BCL-2 exerce son activité anti-apoptotique via quatre mécanismes: inhibition de la libération dans le cytosol du cytochrome c et de l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor), régulation du flux de protons dans les mitochondries, blocage des canaux K^+ et maintien du Ca^{++} dans les réticulums sarcoplasmique et endoplasmique. De plus, une augmentation de l'expression de BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large) a été observée dans les AP remodelées de patients HTAPi, plus particulièrement au niveau des CE-AP (Tu *et al.*, 2011), ainsi que dans un modèle *in vivo* d'HTAP où elle est réduite par des agents pharmacologiques pro-apoptotiques comme le nitroprusside de sodium ciblant la région promotrice de BCL-XL (Suzuki *et al.*, 2007).

La protéine ARC (Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain) semble également être impliquée dans la résistance à l'apoptose de l'HTAP. En effet, cette protéine est un inhibiteur endogène de plusieurs voies de mort cellulaire (voie intrinsèque, voie extrinsèque et liée au stress

oxydant), surexprimée dans le cancer (Mercier *et al.*, 2005) et également dans les poumons de certains patients HTAP. Une augmentation de l'expression protéique de ARC a également été observée dans des modèles *in vivo* expérimentaux d'HTAP, spécifiquement au niveau des CML-AP, associée à une diminution de l'expression des canaux potassiques. De plus, les souris KO ARC sont résistantes au développement d'une HTAP induite par hypoxie chronique (Zaiman *et al.*, 2011).

3.2 Activation de la voie STAT3

L'activation de la voie STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) dans les CML-AP est un élément majeur participant au phénotype pseudo-tumoral de l'HTAP (Paulin *et al.*, 2012) (Figure 11: Conséquences moléculaires de l'activation de la voie STAT3 dans la physiopathologie de l'HTAP). En effet, l'augmentation de sa phosphorylation (en tyrosine 705) et de sa translocation nucléaire a été clairement décrite dans les AP et les CML-AP de patients HTAP (Paulin *et al.*, 2011b). STAT3 est activée en réponse à des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-15) et à des facteurs de croissance (PDGF, ET-1, angiotensine II, TNF) impliqués dans l'HTAP (Brock *et al.*, 2009; Courboulin *et al.*, 2011b; Darnell, 1997; Masri *et al.*, 2007). L'activation de STAT3 en réponse à ces stimuli fait intervenir la protéine Src (en association avec son co-activateur SHP2 (Src homology domain-containing phosphatase 2)), dont l'expression et l'activation est également augmentée dans l'HTAP (Courboulin *et al.*, 2011a; Pullamsetti *et al.*, 2012a; Wong *et al.*, 2005). Une fois activée, la protéine STAT3 augmente l'expression de Pim1 et de NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) en se liant directement à leur région promotrice. Pim1, dont l'expression est spécifiquement augmentée dans les AP HTAP (Paulin *et al.*, 2011b), est un proto-oncogène qui est capable de phosphoryler via son activité de serine/thréonine kinase, et donc d'inactiver des protéines pro-apoptotiques dont la protéine BAD (BCL-2-associated death promoter) (Macdonald *et al.*, 2006), participant ainsi à la résistance à l'apoptose mitochondrie-dépendante des CML-AP dans l'HTAP (Paulin *et al.*, 2011b). De plus, Pim1 est impliqué dans la dérégulation du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses notamment en inhibant p21 et p27 (Narlik-Grassow *et al.*, 2014; Nawijn *et al.*, 2011), qui sont également dérégulées dans l'HTAP (cf. sous-chapitre « Absence de limite à la réplication cellulaire »). Par ailleurs, Pim1 peut interagir avec NFATc2 et favoriser son activation (Glazova *et al.*, 2005;

Meloche *et al.*, 2011). NFATc2, dont l'expression et la translocation nucléaire sont augmentées dans l'HTAP (Bonnet *et al.*, 2007; Paulin *et al.*, 2011b), active alors la protéine anti-apoptotique BCL-2, induisant une résistance à l'apoptose mitochondrie-dépendante des CML-AP dans l'HTAP (Bonnet *et al.*, 2007; Meloche *et al.*, 2011). Par ailleurs, NFAT participe à l'inactivation des canaux potassiques Kv1.5 décrite précédemment au chapitre I (Bonnet *et al.*, 2007). De plus, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca⁺⁺, conséquence de l'inactivation des canaux Kv1.5, active la calcineurine capable de déphosphoryler NFAT, favorisant sa translocation nucléaire et donc son activation. Ainsi se crée une boucle de rétrocontrôle positif à l'origine d'une activation renforcée de NFAT, pouvant expliquer pourquoi les CML-AP HTAP maintiennent leur phénotype pseudo-tumoral en culture cellulaire, en l'absence de facteurs de croissance circulants ou endothéliaux. Cibler cette activation dérégulée de NFAT semble être une piste thérapeutique intéressante. En effet, un inhibiteur de la liaison calcineurine-NFAT appelé VIVIT a d'ores et déjà montré des effets bénéfiques pulmonaires et cardiaques dans des modèles *in vivo* d'HTAP (Bonnet *et al.*, 2007).

Une autre voie de rétrocontrôle positif de STAT3 implique le miR-204, aux propriétés « suppresseur de tumeur » (Wu *et al.*, 2009). En effet, son expression, sous la dépendance négative de STAT3, est diminuée dans les poumons de patients HTAP, et plus particulièrement dans les CML-AP. Le taux de miR-204 est même inversement corrélé à la sévérité de la maladie et pourrait servir comme biomarqueur de l'HTAP. Cette diminution d'expression lève l'effet inhibiteur de miR-204 sur SHP2, permettant une activation renforcée de la voie Src/STAT3 (Courboulin *et al.*, 2011a).

D'autres micro-ARN pourraient aussi être impliqués dans cette boucle d'autoactivation puisqu'il a été montré dans des CE-AP humaines que l'activation de STAT3 par IL-6 conduit à la fixation de STAT3 sur le promoteur du gène C13orf25 induisant l'expression du cluster miR-17/92 (Brock *et al.*, 2009). Etant donné que BMPR2 est une cible directe de miR-20a et miR-17-5-p, l'expression du cluster miR-17/92 pourrait participer à la diminution de l'expression protéique de BMPR2 décrite précédemment. De plus la protéine BMPR2 tronquée serait capable d'augmenter la phosphorylation de Src et ainsi participer à l'activation renforcée de la voie Src/STAT3 (Paulin *et al.*, 2012). Par conséquent, la voie STAT3 activée dans l'HTAP et la voie BMPR2 diminuée dans l'HTAP pourrait être interconnectée.

Par ailleurs, le cluster miR17/92 est le premier à avoir été identifié comme impliqué dans le développement tumoral en étant surexprimé (He *et al.*, 2005) et l'inhibition d'un de ces constituants avec l'antagomir-17 semble être bénéfique dans le traitement de l'HTAP expérimentale (Pullamsetti *et al.*, 2012b).

D'autre part, il a été observé une augmentation de l'expression du Krüppel-like factor 5 (KLF5), dépendante de l'activation de la voie STAT3, dans les poumons de patients HTAP, et plus particulièrement dans les CML-AP. KLF5 étant un facteur de transcription impliqué dans la prolifération des CML de la circulation systémique, dans le remodelage cardiovasculaire (Nagai *et al.*, 2005) et dans la cancérogénèse (Dong *et al.*, 2009), l'utilisation d'un siARN KLF5 dans les CML-AP de patients HTAP a permis de diminuer l'expression protéique de la survivine, de diminuer la potentiel membranaire mitochondriale et d'induire une apoptose cellulaire (Courboulin *et al.*, 2011b).

L'activation de la voie STAT3 pourrait également être impliquée dans la diminution de l'expression de la eNOS et donc dans la biodisponibilité du NO décrite précédemment. En effet, il a été montré qu'une stimulation de CE-AP par l'ET-1 active STAT3, via la protéine PKC δ (Protein kinase C δ), induisant la fixation de STAT3 sur le promoteur de la eNOS, ce qui a pour effet d'inhiber son expression (Sud *et al.*, 2009).

D'un point thérapeutique, la voie STAT3 semble donc être une cible intéressante. Certaines molécules pharmacologiques dont le DHEA (déhydroépiandrostérone), la plumbagine, des mimétiques de miR-204 ou encore l'administration par nébulisation d'un siRNA contre Pim1 ont d'ores et déjà montré des effets prometteurs dans des modèles expérimentaux *in vivo* d'HTAP et/ou sur des cellules de patients HTAP (Courboulin *et al.*, 2012; Courboulin *et al.*, 2011a; Dumas de la Roque *et al.*, 2010; Paulin *et al.*, 2011c).

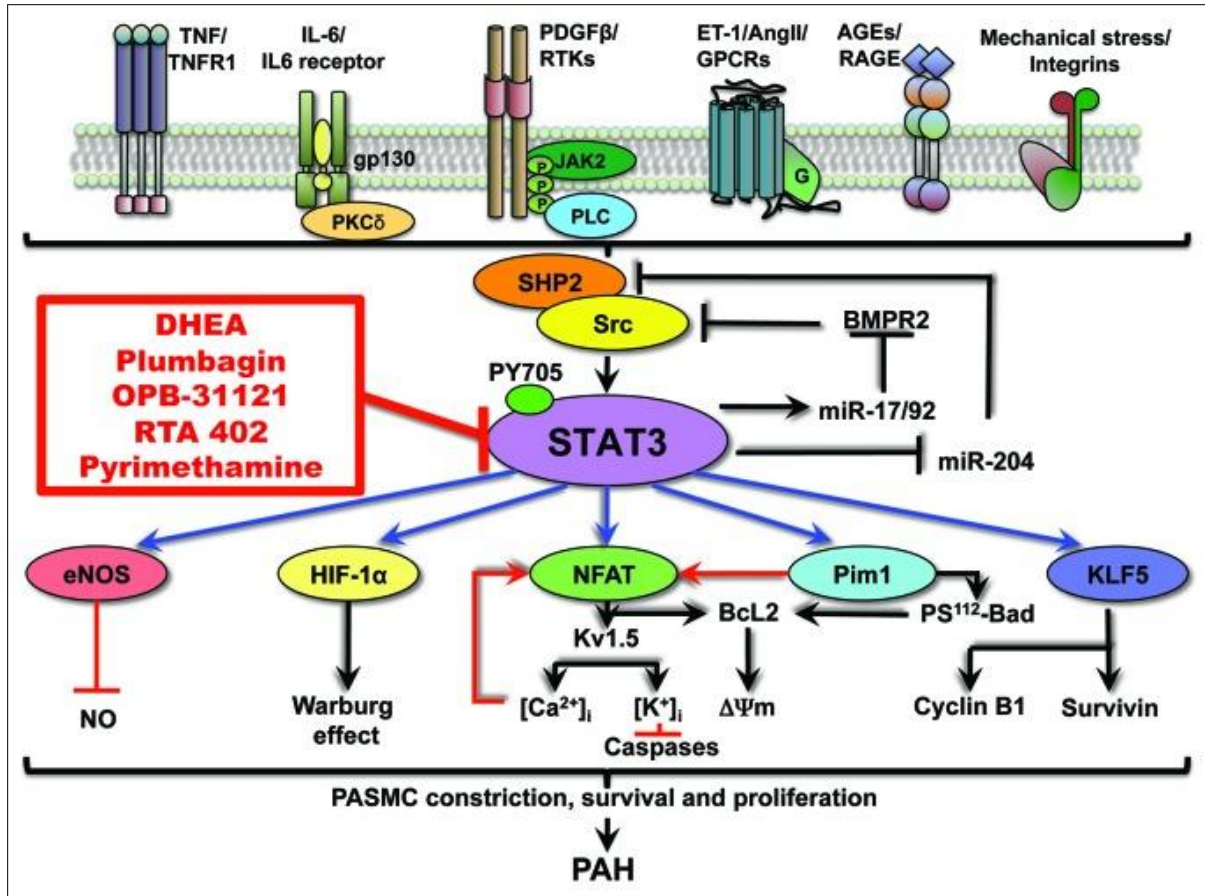


Figure 11: Conséquences moléculaires de l'activation de la voie STAT3 dans la physiopathologie de l'HTAP. Source: (Paulin *et al.*, 2012).

4 Absence de limite à la réplication cellulaire

Le cycle cellulaire est finement régulé par des modulateurs de la progression des différentes phases du cycle cellulaire comprenant les CDK (Cyclin-Dependent Kinases), les cyclines et les inhibiteurs des CDK (CDKI). Parmi les principaux CDKI, la protéine p21 joue un rôle majeur de blocage du cycle principalement en phase G1 contrôlant ainsi la prolifération cellulaire et la sénescence, définie par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Dans certaines études expérimentales d'HTAP induite par la MCT chez le rat, il a été montré une diminution de l'expression de p21 au niveau pulmonaire et cardiaque, suggérant une dérégulation du cycle cellulaire, à l'origine d'une résistance à la sénescence et à une prolifération cellulaire incontrôlée (Kanno *et al.*, 2001; Ravi *et al.*, 2013). Dans cette dernière étude, ce résultat était associé à une diminution de la protéine p53, facteur de transcription régulant l'expression de p21 et inactivé dans le cancer. Les auteurs ont également observé une diminution de

l'expression de p27, un autre CDKI, associée à une augmentation de cyclinD1, signes supplémentaires d'une dérégulation du cycle cellulaire dans l'HTAP (Ravi *et al.*, 2013). Cependant la diminution de p21 ne fait pas consensus dans l'HTAP expérimentale. En effet, dans une étude récente, il a été montré une augmentation de l'expression protéique de p21 en réponse à la MCT (Zhang *et al.*, 2014). En parallèle, dans d'autres études expérimentales d'HTAP induite par hypoxie chronique (8-10% O₂) chez la souris, ou encore chez la souris SM22-5HTT+ développant spontanément une HTAP, l'expression de p21 et de p53 n'était pas diminuée voire augmentée (Abid *et al.*, 2014; Mizuno *et al.*, 2011; Mouraret *et al.*, 2013). Une explication possible à ces derniers résultats est la sensibilité de ces protéines à l'hypoxie. En effet, sur des cellules isolées d'artères pulmonaires (Mizuno *et al.*, 2009), il a été montré qu'une hypoxie sévère entraînait une augmentation de l'expression protéique de p21 et p53 et une diminution de p27 associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, alors qu'une hypoxie modérée entraînait une hyper-prolifération cellulaire associée à une diminution de l'expression protéique de p27 et de p21, sans diminution de p53 (suggérant l'intervention d'un mécanisme indépendant de p53 qui pourrait être une diminution du stress oxydant (O'Reilly *et al.*, 2001)).

Par ailleurs, d'autres études ont plutôt mis en avant le rôle d'une diminution de l'expression de p27 (probablement due à une augmentation de sa dégradation par le protéasome) dans la dérégulation du cycle cellulaire dans l'HTAP conduisant à une absence de limite à la réplication cellulaire (Xu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006).

En culture, les cellules d'AP de patients HTAP ne semblent pas avoir de durée de prolifération limitée puisqu'elles continuent de proliférer après plusieurs passages, au contraire des cellules contrôles, signe évident d'une résistance à la sénescence répllicative, qui pourrait faire intervenir une dysfonction de la télomérase comme dans la plupart des cancers avancés (Artandi *et al.*, 2010).

D'un point thérapeutique, cibler cette absence de limite à la réplication cellulaire est potentiellement intéressant aux regards des effets prometteurs obtenus avec la Nutlin3a, un activateur de p53, dans différents modèles expérimentaux d'HTAP, via une activité pro-sénescence de cette molécule (Mouraret *et al.*, 2013).

5 Angiogénèse

La stimulation de l'angiogénèse participe au développement des tumeurs où des facteurs de croissance pro-angiogéniques sont surexprimés, ce qui est également le cas dans l'HTAP. En effet, l'expression de VEGF, un puissant régulateur de l'homéostasie endothéliale (Ferrara, 2004), associée à celles de son récepteur VEGFR-2, est augmentée notamment au niveau des lésions plexiformes conduisant à une hyperprolifération des CE dans ces lésions et à l'obstruction des artères pulmonaires distales (Hirose *et al.*, 2000; Tuder *et al.*, 2001). Une étude plus récente montrant une augmentation des taux circulants de VEGFR1 soluble et d'endogline chez des patients HTAP suggère que ces deux marqueurs de l'angiogénèse produits par les CE pourraient refléter l'activation des CE-AP et donc être le signe d'un remodelage vasculaire pulmonaire actif et ainsi être des possibles bio-marqueurs de l'HTAP (Malhotra *et al.*, 2013). Dans les modèles *in vivo* d'HTAP par hypoxie chronique, l'expression du VEGF est induite en réponse à l'hypoxie, ce qui modère le développement de l'HTAP en induisant une prolifération endothéliale qui favorise une meilleure irrigation du poumon. Dans ce contexte, le blocage des récepteurs au VEGF par le Sugén5416, associé à une hypoxie chronique, entraîne le développement d'une HTAP plus sévère. En effet, le Sugén5416 induit l'apoptose des CE-AP dans une phase initiatrice qui déstabilise la structure des vaisseaux et conduit par la suite à la formation de lésions complexes de type plexiformes et néo-intimales oblitérant les artères pulmonaires et conduisant au développement d'une HTAP sévère dans ce modèle expérimental (Abe *et al.*, 2010; Nicolls *et al.*, 2012; Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001).

Le rôle de l'angiopoïétine-1 (Ang1) et de son récepteur TIE2 dans la stimulation de l'angiogénèse a été révélée dans l'HTAP où l'expression de Ang1 (par les CML-AP) est augmentée, associée à une augmentation de l'activation de TIE2 (par phosphorylation) dans le plasma et les poumons de patients HTAP (Du *et al.*, 2003; Kumpers *et al.*, 2010; Thistlethwaite *et al.*, 2001). Ang1 est essentiel à la mise en place de structures artérielles pulmonaires matures au cours du développement par recrutement des cellules constitutives des artères pulmonaires (dont les CML-AP) et activation de la maturation et de l'intégrité structurelle des vaisseaux (notamment en favorisant la formation de tubes endothéliaux). En effet, la stimulation de CE-AP par Ang1 induit la sécrétion de 5-HT créant ainsi une voie d'activation

paracrine favorisant l'hyperplasie des CML-AP (Dewachter *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2003). Cependant la présence de l'antagoniste d'Ang1 qu'est Ang2 déstabilise la structure des vaisseaux. Or Ang2 est surexprimé dans les poumons HTAP, particulièrement au niveau des lésions plexiformes (Kumpers *et al.*, 2010), participant ainsi à la raréfaction vasculaire observée dans les poumons HTAP (qualifié d'aspect en « arbre mort ») (Ritman, 2005).

Par ailleurs, le recrutement de cellules progénitrices circulantes issues de la moelle osseuse a été mis en évidence dans le remodelage et la néo-vascularisation dans l'HTAP (Davie *et al.*, 2004; Toshner *et al.*, 2009). En effet, une augmentation du nombre de cellules c-kit⁺ est observée dans les AP remodelées de patients HTAPⁱ, associée à une expansion du vasa vasorum qui irrigue les AP remodelées. De plus, le vasa vasorum semble surexprimer la chimiokine CXCL12/SDF1, ce qui pourrait participer au recrutement des cellules c-kit⁺ (Montani *et al.*, 2011).

6 Inflammation

Au chapitre précédent, nous avons montré qu'une inflammation chronique participe au remodelage vasculaire caractéristique de l'HTAP, associée à une production d'auto-anticorps, signe d'une altération de l'immunité. Dans le cancer, l'inflammation joue également un rôle important à tous les stades du développement tumoral. En effet, de manière comparable à l'HTAP, le microenvironnement tumoral contient des infiltrats de cellules inflammatoires qui communiquent entre elles et avec les cellules environnantes par stimulation autocrine et/ou paracrine en produisant des cytokines et chimiokines (Grivennikov *et al.*, 2010).

7 Instabilité génomique

Nous avons vu précédemment, le rôle sur la prolifération cellulaire de mutations du gène *BMPR2* dans le développement du remodelage vasculaire dans l'HTAP. En effet, il a été identifié des mutations hétérozygotes germinales sur le gène *BMPR2* dans environ 70% des HTAP^h et 25% des HTAPⁱ qui peuvent être de deux types: « faux-sens » dans 30% des cas, modifiant la fonction du récepteur, et « non-sens » dans 70% des cas, produisant un transcrit non-sens et conduisant à un état d'insuffisance haploïde (Machado *et al.*, 2009; Rudarakanchana *et al.*, 2002). Alors que les souris *BMPR2* ^{-/-}

meurent au stade de l'embryogénèse, les hétérozygotes *BMPR2* +/- survivent à l'âge adulte. Cependant quand ces souris hétérozygotes sont exposées à une inflammation par surexpression pulmonaire de 5-lipoxygénase (Song *et al.*, 2005) ou à une perfusion chronique de 5-HT (Long *et al.*, 2006), elles développent une hypertension pulmonaire plus importante que les souris non mutées. Ainsi, par extrapolation, ceci suggère que le développement d'une HTAPh n'est pas seulement la conséquence d'une mutation mais qu'interviennent d'autres facteurs, environnementaux et/ou génétiques, chez une personne présentant une susceptibilité génétique. Ceci peut également expliquer la faible pénétrance (10-20 %) du développement d'une HTAP chez les personnes porteuses de mutations *BMPR2*.

Par ailleurs, dans certaines familles d'HTAPh et chez la majorité des HTAPi aucune mutation du gène *BMPR2* n'a été identifiée. Des mutations sur d'autres gènes de la voie BMP/TGF- β ont été décrites chez des patients avec une histoire personnelle ou familiale de maladie de Rendu-Osler: le gène *ALK1* (ou *ACVRL1* codant pour l'Activin receptor-Like Kinase 1) et le gène *ENG* (codant pour l'endogline) (Chaouat *et al.*, 2004; Trembath *et al.*, 2001). Il a également été rapporté des mutations sur les gènes *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD8* et *SMAD9*, impliquant directement la voie de transduction de signal de TGF- β (Nasim *et al.*, 2011; Shintani *et al.*, 2009). L'implication de mutations sur le gène *CAVI* (codant pour la cavéoline-1), protéine initiant des voies de signalisation cellulaire dont la voie TGF- β , a également été révélée récemment chez un patient HTAPi (Austin *et al.*, 2012).

D'un point de vue clinique, il a été montré que les patients porteurs de mutations *BMPR2* ou *ALK1* sont plus jeunes au moment du diagnostic de l'HTAP que les patients idiopathiques, associés à des paramètres hémodynamiques plus sévères (Girerd *et al.*, 2010; Sztrymf *et al.*, 2008).

D'autres voies sont également touchées par cette instabilité génomique. En effet, 17 SNP (Single-nucleotide polymorphisms) dans le gène *KCNA5* codant pour le canal Kv1.5 ont été décrits chez des patients HTAPi (Remillard *et al.*, 2007) et des mutations ont été retrouvées récemment sur le gène *KCNK3*, codant pour des canaux potassiques non pas voltage-dépendants comme pour le Kv1.5 mais pH-dépendants, impliqués dans le maintien du potentiel de membrane cellulaire et la relaxation des

CML-AP (Ma *et al.*, 2013). Ces mutations sont donc associées à une altération du courant K^+ dans les cellules. Par ailleurs, des polymorphismes dans la région promotrice du gène codant pour le 5HTT altèrent l'expression de ce transporteur (expression 2 à 3 fois plus importante avec l'allèle « long » par rapport à l'allèle « court ») et donc la voie du 5HT, influençant ainsi la progression de la maladie (Eddahibi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2013).

Similairement au cancer, les CE constitutives des lésions plexiformes présentent une instabilité génomique microsatellite au niveau de hMSH2 (DNA mismatch repair protein) associées à des mutations sur les gènes *TGFBR2* et *BAX*, leur conférant un avantage sélectif pro-prolifératif (Yeager *et al.*, 2001).

De plus, des anomalies ou réarrangements chromosomiques somatiques ont été mis en évidence sur les chromosomes 8, 13 et X chez 5 patients HTAP au cours d'une étude du génome par microarray dans les CML-AP et les CE-AP de 9 patients HTAP avec ou sans mutation germinale *BMPR2* associée (Aldred *et al.*, 2010).

8 Désordres métaboliques cellulaires

Le principal désordre métabolique cellulaire observé dans l'HTAP est un shift métabolique dans la production énergétique de la phosphorylation oxydative du glucose au profit de la glycolyse aérobie, appelé « effet Warbourg » dans le cancer, avec comme origine l'inhibition de l'enzyme mitochondriale primordiale dans l'oxydation du glucose, la pyruvate déshydrogénase (PDH).

Le phénotype métabolique anormal observé chez les patients HTAP est caractérisé par: une altération de la morphologie et du nombre de mitochondries, une augmentation de la capture du glucose, une diminution de l'activité de la PDH, une augmentation du taux glycolytique associée à une augmentation de la production de lactate, une augmentation de l'influx calcique, une diminution de l'activité du complexe 4 de la chaîne respiratoire mitochondriale, une diminution de la production d'ERO (Espèces réactives de l'oxygène) et une hyperpolarisation mitochondriale (Archer *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2006; Dromparis *et al.*, 2010; McMurtry *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2010; Sutendra *et al.*, 2010; Sutendra *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2007).

Le régulateur principal de ce shift glycolytique est l'activation de HIF-1 α observée chez les patients HTAP. Cette augmentation de HIF-1 α est facilement compréhensible dans les cas d'HTAP secondaire à une hypoxie chronique puisque HIF-1 α est directement activé en condition hypoxique mais elle est également retrouvée chez les patients HTAPi (Fijalkowska *et al.*, 2010) et chez les rats Fawn-Hooded qui développent spontanément une HTAP (Bonnet *et al.*, 2006), on parle alors d'activation normoxique de HIF-1 α . Il est probable que la diminution du NO et de la SOD2 (superoxyde dismutase), dont l'expression est réduite par un mécanisme épigénétique de méthylation de séquences clés CpG dans l'HTAP (Archer *et al.*, 2010a), contribue à l'expression pathologique de HIF-1 α (Bowers *et al.*, 2004; Fijalkowska *et al.*, 2010). En se liant à la séquence HRE (Hypoxia Responsive Element) dans le promoteur de ses gènes cibles, HIF-1 α induit l'expression de bon nombre de protéines incluant des protéines impliquées dans le shift glycolytique (Seagroves *et al.*, 2001) et en premier lieu: la PDK1 (pyruvate déshydrogénase kinase1) qui inhibe alors la PDH, principale porte d'entrée vers l'oxydation du glucose. D'autres cibles de HIF-1 α pourraient participer au shift glycolytique et au maintien effectif de la glycolyse aérobie dans l'HTAP: les transporteurs du glucose GLUT 1 et 3, favorisant la capture du glucose par les cellules; la lactate déshydrogénase A (LDHA), l'hexokinase (HK), la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase M2 (PKM2), enzymes impliquées dans la glycolyse; la sous-unité 4 de la cytochrome c oxidase (activation de COX4-2 et inhibition de COX4-1) faisant partie du complexe 4 de la chaîne respiratoire mitochondriale et donc impliquée dans la génération d'ATP (Adénosine triphosphate) et la production d'ERO; et le miR210 impliqué dans la respiration mitochondriale (Figure 12: Conséquences moléculaires de l'activation normoxique de HIF-1 α) (Cottrill *et al.*, 2013; Manalo *et al.*, 2005; Tuder *et al.*, 2012).

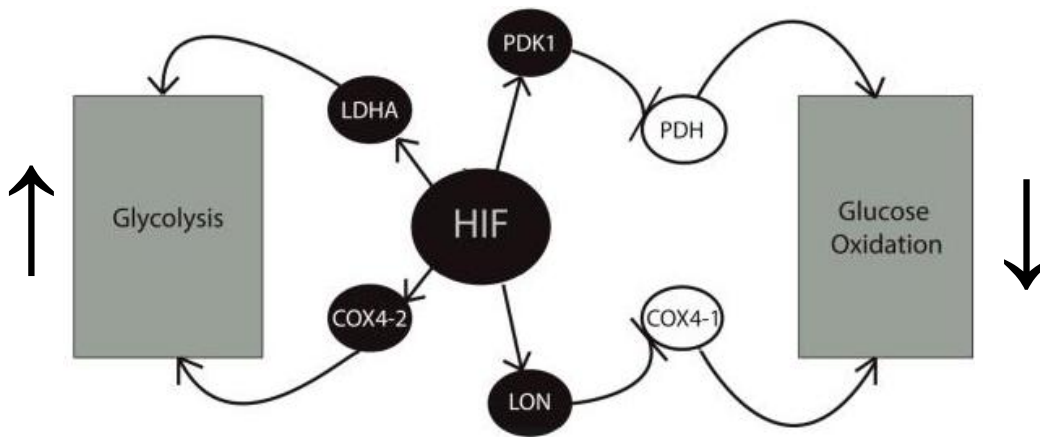


Figure 12: Conséquences moléculaires de l'activation normoxique de HIF-1 α .
Source: (Cottrill *et al.*, 2013)

Une des conséquences du shift glycolytique est une diminution de la production d'ERO, due en partie à une diminution de l'activité du cycle de Krebs impliqué dans l'oxydation du glucose. Par ailleurs, une diminution d'expression de la SOD2 observée dans l'HTAP (Fijalkowska *et al.*, 2010) participe également à cette moindre production d'ERO, en particulier de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), étant donné que son activité est de convertir les anions superoxydes en H₂O₂. Cette diminution de production d'ERO a plusieurs conséquences intracellulaires dont l'activation de HIF-1 α créant une boucle de rétrocontrôle positif pouvant expliquer le maintien effectif et sur le long terme de l'activation normoxique de HIF-1 α (Bonnet *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 1996) et l'inhibition des canaux potassiques sensibles à l'O₂, dont le Kv1.5, contrôlant le potentiel membranaire cellulaire (Pozeg *et al.*, 2003).

Ainsi on parle d'un état redox pseudo-hypoxique dans l'HTAP comme dans le cancer, caractérisé par une stabilité de HIF-1 α , un shift glycolytique dans le métabolisme mitochondriale et une diminution normoxique de la production d'ERO (**Figure 13:** Rôle de la mitochondrie dans la physiopathologie de l'HTAP). D'un point de vue thérapeutique, il semble très intéressant de cibler ce phénotype métabolique anormal. Ainsi un inhibiteur de PDK, le dichloroacétate, a d'ores et déjà montré des résultats prometteurs dans plusieurs études précliniques (Guignabert *et al.*, 2009; McMurtry *et al.*, 2004; Michelakis *et al.*, 2002; Tuder *et al.*, 2012) et est actuellement en cours d'investigations cliniques (étude NCT01083524, Michelakis and Wilkins). De part son mécanisme d'action, il lève

l'inhibition exercée sur la PDH qui devient alors active et capable de convertir le pyruvate en acétyl-CoA, ce qui permet d'initier la phosphorylation oxydative du glucose.

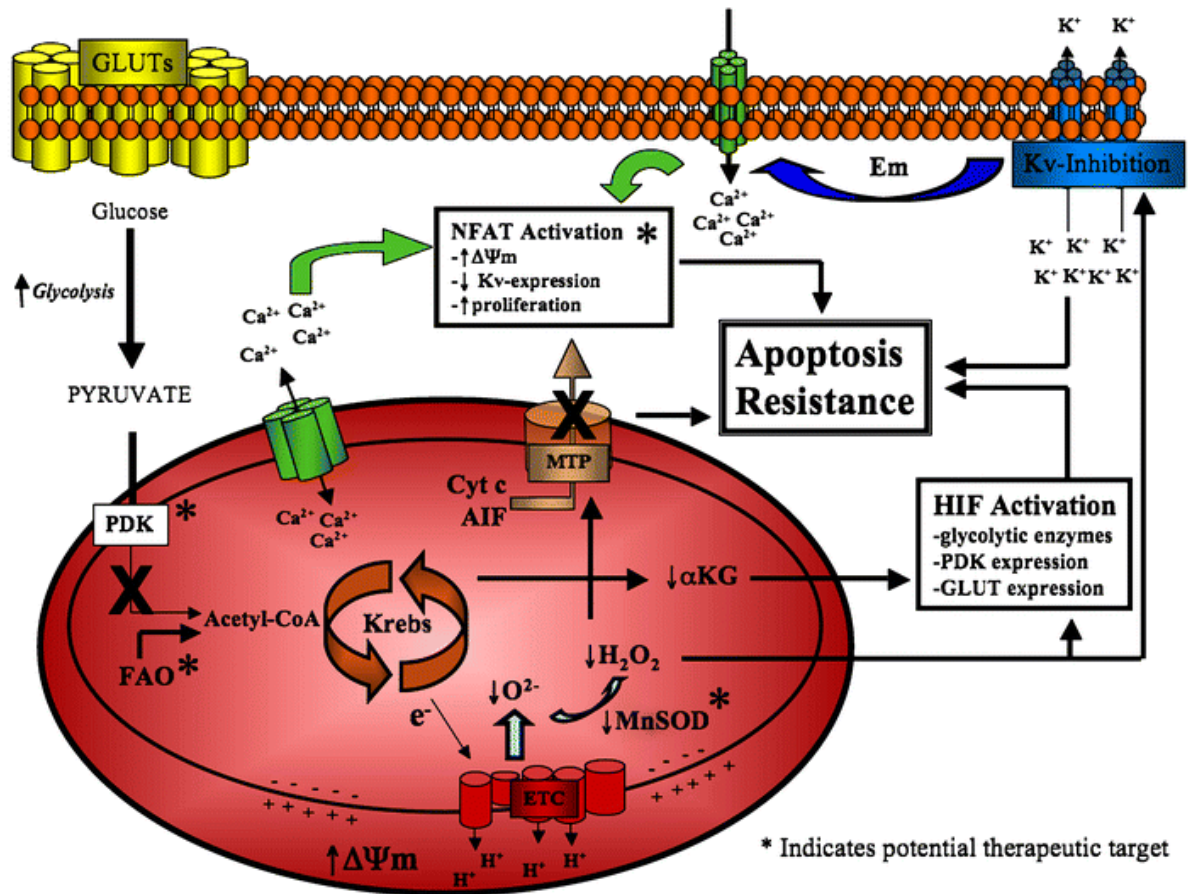


Figure 13: Rôle de la mitochondrie dans la physiopathologie de l'HTAP.

Source: (Dromparis *et al.*, 2010)

Récemment, il a également été question d'une augmentation de la fission mitochondriale dans l'HTAP, sans que son rôle ne soit très clairement établi pour l'heure. En effet, deux protéines impliquées dans ce processus semblent suractivées: la cyclin B1-CDK1 qui phosphoryle et active la dynamin related protein 1 (DRP1), le médiateur clé de la fission mitochondriale. HIF-1 α pourrait être impliqué dans ce processus puisque son activation entraîne une fission mitochondriale via l'activation de DRP1 (Marsboom *et al.*, 2012).

Associé à ces altérations au sein des mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE) semble également jouer un rôle. En effet, la protéine Nogo, régulatrice de la structure du RE, est augmentée dans le sérum de patients HTAP et dans des CML-AP placées en hypoxie, associé probablement à une

dérégulation des protéines découplantes, contribuant à une augmentation anormale de la distance entre mitochondries et RE, à une altération des échanges calciques entre ces organites et donc à une diminution du calcium mitochondriale, inhibant l'activité des enzymes mitochondriales sensibles au calcium (Dromparis *et al.*, 2013b; Richter *et al.*, 2004; Sutendra *et al.*, 2011; Yeager *et al.*, 2012). Ainsi une dérégulation de stress du RE semble participer au remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTAP et l'atténuation du stress du RE par des agents pharmacologiques réverse et prévient ce remodelage dans des modèles *in vivo* d'HTAP (Dromparis *et al.*, 2013a; Koyama *et al.*, 2014).

9 Invasion tissulaire et métastase

La propriété des cellules cancéreuses de s'échapper de la tumeur primitive pour former des métastases dans d'autres organes n'est pas une caractéristique retrouvée dans l'HTAP. En effet, les altérations décrites précédemment ne sont observées qu'au sein de la vasculature pulmonaire (ainsi que dans le ventricule droit pour certaines caractéristiques comme les changements métaboliques (Paulin *et al.*, 2014; Sutendra *et al.*, 2013)). De plus, les patients transplantés pour HTAP ne développent pas de remodelage vasculaire au sein du poumon greffé. Ainsi le phénotype « cancer-like » de l'HTAP a ses limites, d'où le terme préférentiellement employé de phénotype « pseudo-tumoral » pour la physiopathologie de l'HTAP.

Chapitre 3: La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

A l'époque de sa découverte en 1979, la protéine p53 fut initialement présentée comme un proto-oncogène étant donné sa localisation et son implication dans l'immortalisation des cellules (Crawford *et al.*, 1981; Lane *et al.*, 1979; Linzer *et al.*, 1979). Cependant en 1989, la découverte de mutations altérant l'activité de p53 dans de nombreuses tumeurs (Hinds *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989) a conduit à une réévaluation de l'implication de cette protéine dans la cancérogénèse et elle est maintenant considérée comme un suppresseur de tumeur. Depuis, de très nombreuses études ont été menées pour mieux comprendre et identifier sa structure, sa fonction, sa régulation et son implication dans la physiologie des cellules saines et cancéreuses, dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses.

1 Structure de p53

1.1 Le gène TP53

Chez l'homme, le gène codant pour la protéine p53 est localisé sur le bras court du chromosome 17, locus 17p13.1, fréquemment muté dans les cancers. Il est composé de 20303 nucléotides, divisés en 11 exons (le premier n'étant pas codant) et 10 introns (Figure 14: Structure schématique du gène TP53). Ce gène est transcrit en un ARNm de 2,2 kb puis traduit en une protéine entière de 393 acides aminés de 53 kDa. Des sites d'épissages alternatifs et un deuxième promoteur ont été décrits dans le gène TP53 à l'origine de l'existence d'au moins 12 isoformes de p53 dans les cellules humaines, dont les plus connus sont les $\Delta 40p53$, $\Delta 133p53$ et $\Delta 160p53$, qui pourraient agir comme des régulateurs négatifs de l'activité de p53 (Khoury *et al.*, 2010; Marcel *et al.*, 2011).

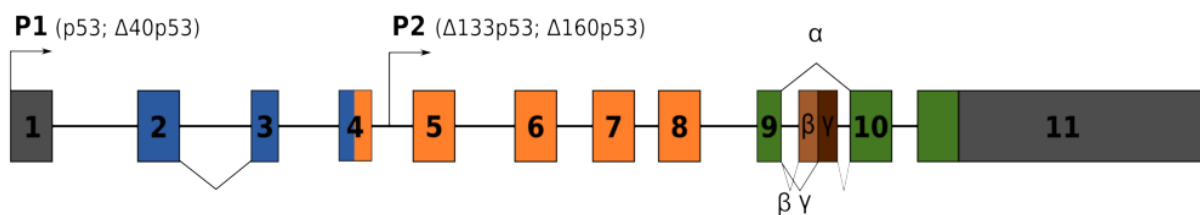


Figure 14: Structure schématique du gène TP53. Le gène TP53 est représenté avec ces 11 exons, ces 2 promoteurs et ces sites d'épissages alternatifs. Source: (Marcel *et al.*, 2011)

1.2 La protéine p53

La protéine p53 entière est composée de cinq domaines structuraux principaux (Figure 15: Structure schématique du gène *TP53* et des domaines fonctionnels de la protéine p53):

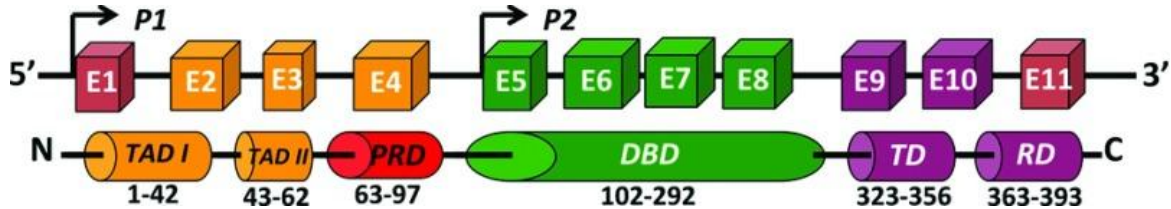


Figure 15: Structure schématique du gène *TP53* et des domaines fonctionnels de la protéine p53.

E: Exon; P: Promoteur; TAD: domaine de transactivation; PRD: domaine riche en prolines; DBD: domaine de liaison à l'ADN; TD: domaine de tétramérisation ou d'oligomérisation; RD: domaine de régulation.

- Un premier domaine de transactivation (acides aminés 1 à 42) dans la partie N-terminale, impliqué dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de p53. Il est le site de fixation des régulateurs principaux de p53 que sont MDM2 et MDM4 (mouse double minute 2 et 4), et de ses co-activateurs transcriptionnels comme p300/CBP (CREB-binding protein). Il contient également une séquence qui cible l'export nucléaire de p53 (acides aminés 11 à 27).
- Un deuxième domaine de transactivation contenant une région riche en prolines (acides aminés 64 à 94) composée de cinq motifs PXXP (P pour Proline et X pour un autre acide aminé) sur lesquels peuvent venir se fixer des protéines avec des domaines SH3 et qui semble jouer un rôle dans la stabilisation de p53.
- Le domaine central de liaison à l'ADN (acides aminés 102 à 292) permettant à p53 d'exercer son activité de facteur de transcription en se liant spécifiquement aux promoteurs de ses gènes cibles au niveau de séquences consensus au motif suivant: 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' (R pour Purine et Y pour Pyrimidine), séparées par 0 à 13 paires de bases. Dans les tumeurs, la plupart des mutations sont retrouvées dans la séquence codant pour ce domaine central de liaison à l'ADN, induisant un défaut (absence et/ou erreur) de liaison à l'ADN de p53.
- Le domaine d'oligomérisation (acides aminés 323 à 356) impliqué dans la formation d'homotétramères de p53, structure qui se lie effectivement à l'ADN (Figure 16: Illustration de la

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

structure tétramérique de p53 se liant à une molécule d'ADN au centre). Ce domaine contient également des séquences qui ciblent l'import (acides aminés 305 à 323) et l'export (acides aminés 340 à 351) nucléaire de p53.

- Le domaine de régulation (acides aminés 363 à 393) dans la partie C-terminale, qui contient un domaine de liaison non spécifique à l'ADN en cas de stress génotoxique. Cette région contrôle la fixation spécifique du domaine central à l'ADN et contient deux séquences qui ciblent l'import nucléaire de p53.

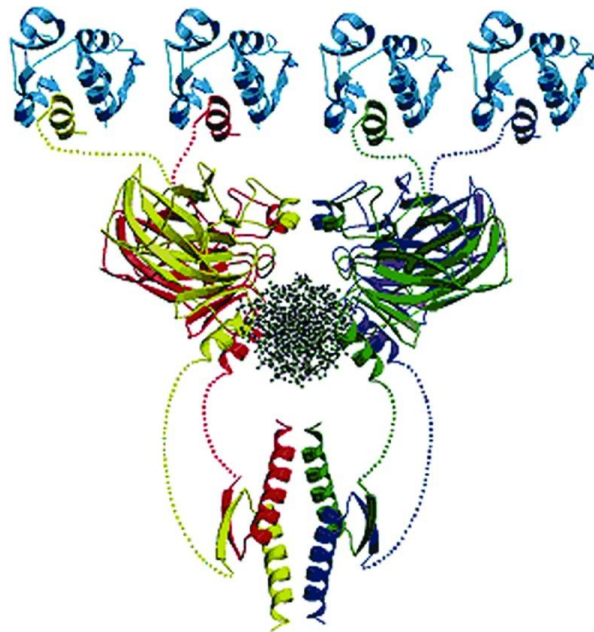


Figure 16: Illustration de la structure tétramérique de p53 se liant à une molécule d'ADN au centre.

1.3 Les protéines homologues de p53

La protéine p53 a deux homologues: p63 et p73 qui font parties de la même famille de facteur de transcription présentant par conséquent une structure fonctionnelle classique similaire de facteur de transcription (un domaine de transactivation N-terminal, un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine d'oligomérisation C-terminal) suivie de domaines supplémentaires en C-terminal appelés SAM (pour Sterile Alpha Motif) qui semblent impliquer dans les interactions protéines-protéines (Figure 17: Structures schématiques du gène et des différentes isoformes de p63/p73). Ces protéines présentent également une homologie de séquence entre elles et avec p53, en particulier au niveau du domaine central de liaison à l'ADN. Les gènes *TP63* et *TP73* partagent une organisation génomique

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

similaire comprenant deux promoteurs à l'origine de deux types de protéines: une forme entière appelée TA et une forme tronquée (sans domaine de transactivation) appelée ΔN . Les formes TA ont des propriétés proches de celles de p53 alors que les formes ΔN antagonisent les fonctions de p53 et des formes TA par compétition sur les sites de liaison à l'ADN et fixation directe sur ces protéines via leur domaine d'oligomérisation. En outre, une boucle d'auto-régulation existe entre ces protéines puisque les protéines p53 et TAp73 induisent directement la transcription de $\Delta Np73$ en se liant aux promoteurs ΔN sur le gène *TP73*. Par ailleurs, des épissages alternatifs peuvent également avoir lieu dans la partie C-terminale à l'origine des isoformes α , β ou γ touchant les domaines SAM (Yang *et al.*, 2000).

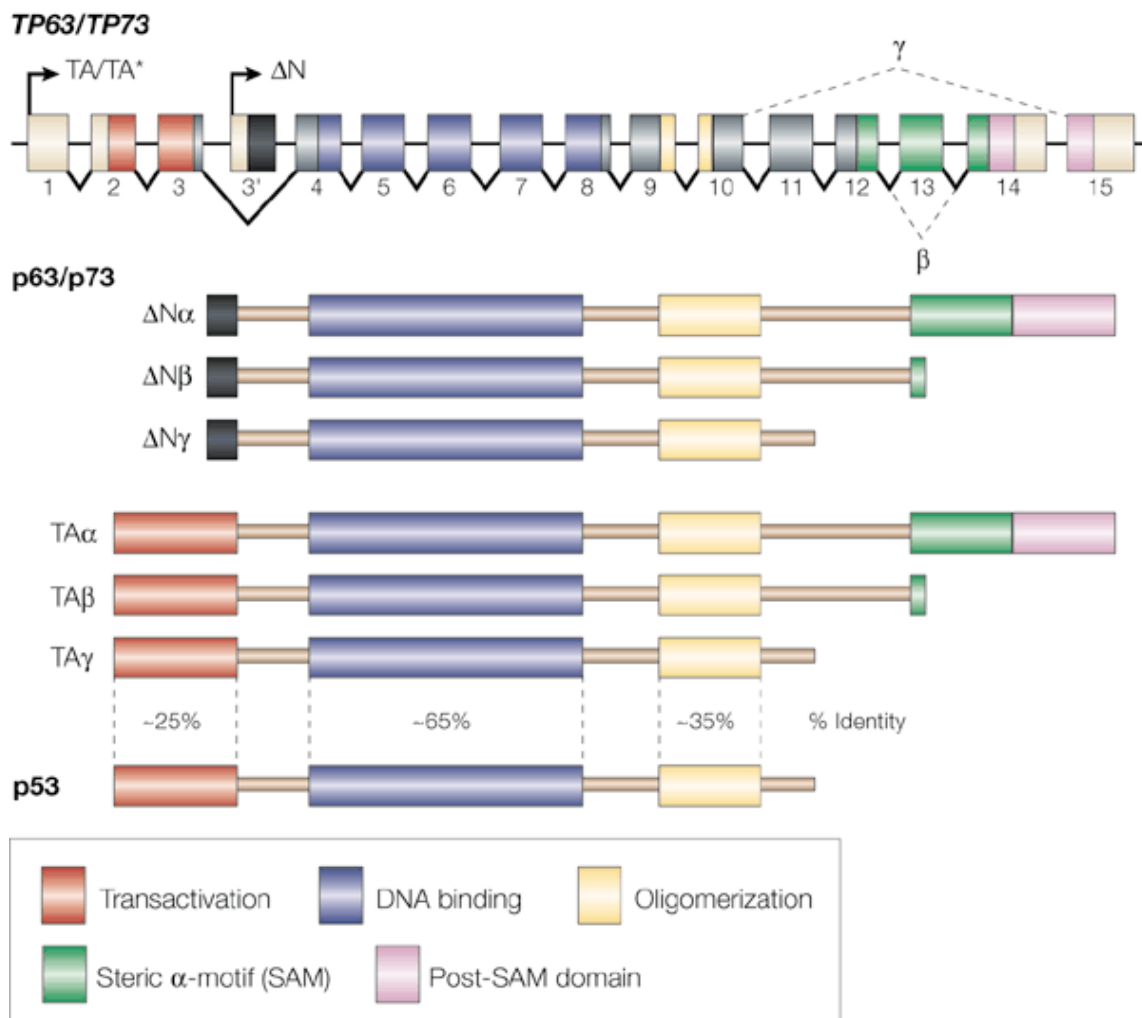


Figure 17: Structures schématiques du gène et des différentes isoformes de p63/p73.

Source: (Yang *et al.*, 2000)

2 Fonctions cellulaires de p53

En tant que suppresseur de tumeur, la protéine p53 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome (d'où son surnom de « gardien du génome ») dans le but d'empêcher une prolifération cellulaire inappropriée. En effet, via son activité principale de facteur de transcription mais également en interagissant directement avec des protéines intracellulaires, p53 régule l'activité de protéines impliquées dans des voies de signalisation conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire réversible ou permanent (la sénescence), associé à la réparation de l'ADN si elle est nécessaire et possible, ou bien à la mort cellulaire par apoptose si les dommages cellulaires sont trop importants (Shu *et al.*, 2007; Vousden *et al.*, 2002). P53 exerce également des fonctions dans les processus métaboliques, autophagiques et angiogéniques.

2.1 Contrôle du cycle cellulaire

En fonction des dommages cellulaires, p53 peut induire un arrêt transitoire du cycle cellulaire en phase G1 empêchant à l'ADN endommagé d'être répliqué, un arrêt en phase G2 permettant la suspension du cycle avant la mitose ou un arrêt irréversible du cycle cellulaire conduisant à la sénescence.

- Arrêt en phase G1

Cette fonction de p53 implique l'activation de l'expression de son gène cible *CDKN1A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) codant pour la protéine p21, le principal régulateur du point de passage G1/S (el-Deiry *et al.*, 1994). En effet, p21 fait parti de la famille des inhibiteurs des CDK et bloque le cycle cellulaire en phase G1 en se fixant sur et donc inactivant le complexe [cyclineE/CDK2], empêchant ainsi la phosphorylation de la protéine Rb et la libération de E2F, nécessaire à l'entrée en phase S.

- Arrêt en phase G2

L'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 est le résultat d'une déstabilisation du complexe [cyclineB1/CDC2], régulateur clé du point de passage G2/M. En effet, p53 induit l'expression de GADD45 (Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein) qui se lie à CDC2 (Cell Division Cycle protein 2, aussi appelée CDK1) empêchant la formation du complexe [cyclineB1/CDC2] (Zhan

et al., 1999). De plus, p53 induit l'expression de 14-3-3 δ (Hermeking *et al.*, 1997), qui empêche l'activation de CDC2 en séquestrant sa kinase activatrice CDC25.

- Sénescence

Le programme effecteur de la sénescence comprend les voies p53/p21 et Rb/p16 qui bloquent irréversiblement les points de contrôle du cycle cellulaire. Le raccourcissement des télomères au-delà d'un seuil critique (sénescence répllicative) ou l'exposition à des oncogènes ou à des facteurs de stress initient des signaux de dommages de l'ADN qui aboutissent à l'activation des voies effectrices de la sénescence, au cours desquelles la protéine p53 est directement impliquée en induisant l'expression de p21 mais aussi de E2F7 qui aboutissent à l'inactivation de E2F (Kuilman *et al.*, 2010; Laine *et al.*, 2014; Rufini *et al.*, 2013; Shay *et al.*, 1991).

2.2 Réparation de l'ADN

L'arrêt du cycle cellulaire (notamment en phase G1) permet à la cellule endommagée d'avoir du temps pour réparer son ADN, ainsi p53 joue un rôle très important dans le maintien de la stabilité du génome. P53 est impliquée dans divers types de réparation à l'ADN: la réparation par excision de nucléotide (NER), la réparation par excision de bases (BER), la recombinaison homologue (HR) et la recombinaison non homologue des extrémités (NHEJ), via son activité transcriptionnelle et des interactions protéines-protéines.

- NER: p53 peut induire l'expression de XPC (Xeroderma Pigmentosum group C) et DDB2 (DNA Damage-Binding protein 2) impliquées dans la détection du dommage à l'ADN et se lier et donc moduler l'activité de XPB et XPD (Xeroderma Pigmentosum B et D) (respectivement ATPase et hélicase), deux sous-unités du facteur TFIIH (Transcription Factor II Human) effecteur de l'excision (Adimoolam *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 1999). P53 induit aussi l'expression de GADD45 et de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), impliqués entre autre dans la NER (Smith *et al.*, 2000).
- BER: p53 peut interagir avec des constituants du système BER comme l'endonucléase APE1 (Apurinic/aprimidinic endonuclease 1) et l'ADN polymérase β (Seo *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001).

- HR: p53 peut interagir avec RAD51 et RAD54, deux composants majeurs de la recombinaison homologue (Linke *et al.*, 2003).

2.3 Apoptose

Si nécessaire, p53 peut induire l'apoptose cellulaire pour éliminer les cellules trop endommagées (modèle « death threshold ») (Fridman *et al.*, 2003; Kracikova *et al.*, 2013). Son activité transcriptionnelle est très importante dans ce processus intégrant deux voies parallèles: la voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort et la voie intrinsèque dépendante des mitochondries.

Au cours de la voie extrinsèque, activée par exemple au cours de la réponse immunitaire, p53 peut transactiver l'expression de récepteurs de mort localisés sur la membrane plasmique comme le DR4, le DR5 et le CD95/Fas, qui initient l'apoptose par activation de la caspase 8 lors de la fixation de leur ligand (TRAIL et CD95L/FasL). L'expression de la protéine transmembranaire PERP (p53 apoptosis effector related to PMP-22) peut également être transactivée en réponse à d'importants dommages à l'ADN (Ihrie *et al.*, 2003; Reczek *et al.*, 2003).

P53 peut activer la voie intrinsèque en induisant l'expression des protéines pro-apoptotiques mitochondriales: BAX (BCL-2-associated X), NOXA (ou phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), BID (BH3 interacting-domain death agonist), BAD, p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein 1)... qui favorisent la chute du potentiel membranaire mitochondrial et la libération de cytochrome c conduisant à la formation d'un apoptosome avec APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1) (dont l'expression est également induite par p53) et la caspase-9. De plus, p53 peut réprimer l'expression des protéines anti-apoptotiques mitochondriales BCL-2 et BCL-XL et des protéines inhibitrices d'apoptose (famille IAP) comme la survivine. Par ailleurs, p53 peut transactiver des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques localisées dans le cytoplasme telles que: la protéine PTEN s'opposant à la voie de survie PI3K/AKT (Mayo *et al.*, 2002), la protéine PIDD (p53-induced protein with a death domain) qui interagirait avec la caspase 2 pour engager la voie mitochondriale (Bock *et al.*, 2012; Oliver *et al.*, 2011), la protéine PIG3 (P53-Inducible Gene 3) impliquée dans l'induction de l'apoptose en condition

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

de stress oxydant (Kotsinas *et al.*, 2012; Polyak *et al.*, 1997) et la caspase 6 considérée comme une caspase effectrice (MacLachlan *et al.*, 2002).

Parallèlement et même précédent cette réponse transcriptionnelle de p53 qui nécessite un certain temps pour se mettre en place (plusieurs heures), p53 peut agir directement (en quelques minutes) au niveau des mitochondries (Erster *et al.*, 2004; Sansome *et al.*, 2001). En effet, p53 peut se lier et inhiber l'activité des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL et donc faciliter l'activité pro-apoptotique de BAX (Mihara *et al.*, 2003). P53 peut également se lier à BAX, BAD et BAK (BCL-2 homologous antagonist/killer) et favoriser directement leur activité pro-apoptotique (Chipuk *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006; Leu *et al.*, 2004).

2.4 Métabolisme

La protéine p53 joue également un rôle dans le métabolisme cellulaire où elle exerce des activités qui contrecarrent le développement tumoral en s'opposant à l'effet Warbourg (Liang *et al.*, 2013; Olovnikov *et al.*, 2009; Vousden *et al.*, 2009b). En effet, p53 ralentit la glycolyse en modulant trois de ses étapes: diminution de l'expression des transporteurs membranaires du glucose tels que GLUT1, GLUT3 et GLUT4 conduisant à une diminution du taux de glucose intracellulaire, la source initiatrice de la glycolyse (Kawauchi *et al.*, 2008; Schwartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2004); induction de l'expression de TIGAR (TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator) qui inactive la PFK (phosphofructo-kinase), enzyme de la troisième étape de la glycolyse (Bensaad *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2006); et inhibition de la PGM (phosphoglycérate mutase) qui intervient dans les dernières étapes de la glycolyse (Corcoran *et al.*, 2006). Parallèlement, p53 inhibe la voie des pentoses phosphates, responsable du catabolisme du glucose pour former du NADPH et du ribose, en inactivant l'enzyme clé de cette voie: la G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) (Jiang *et al.*, 2011).

De plus, p53 stimule la phosphorylation oxydative mitochondriale. En effet, p53 augmente l'expression de la SCO2 (synthesis of cytochrome c oxydase 2), favorisant ainsi l'activité du complexe COX (cytochrome c oxydase), le quatrième complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (Matoba *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2003). P53 active également la transcription de AIF qui participe au

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

maintien de l'intégrité du premier complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (Stambolsky *et al.*, 2006). D'autres cibles de p53 sont impliquées dans l'activation de la phosphorylation oxydative mitochondriale de manière indirecte: la GLS2 (glutaminase 2) qui favorise entre autres la production de glutamate et d' α -cétoglutarate (Hu *et al.*, 2010), la protéine Parkine qui active le complexe PDH (pyruvate déshydrogénase) nécessaire à la conversion du pyruvate en acétyl-CoA (Zhang *et al.*, 2011a), la transrepression de la PDK2 (pyruvate déshydrogénase kinase 2) qui inhibe l'activité du complexe PDH (Contractor *et al.*, 2012), et l'augmentation de l'expression de la ribonucléotide réductase p53R2 qui participe au maintien de l'intégrité de l'ADN mitochondrial (Bourdon *et al.*, 2007; Kulawiec *et al.*, 2009).

Une des conséquences de l'activation de la phosphorylation oxydative mitochondriale par p53 pourrait être une augmentation de production d'ERO endogènes, mais le système est finement régulé étant donné que p53 active également les processus de défense anti-oxydante en vue de contrecarrer d'éventuels effets délétères de ces ERO. En effet, en conditions physiologiques et à des taux faibles d'activation, p53 exerce une activité anti-oxydante impliquant la transactivation de protéines telles que la GPX1 (glutathion peroxydase 1), la SOD2, les sestrines 1 et 2, la GLS2, la TP53INP1 (Tumor protein p53-Inducible Nuclear Protein 1) et l'ALDH4 (aldéhyde déshydrogénase 4). En revanche, en conditions de stress de forte intensité, p53 semble exercer une activité pro-oxydante en induisant l'expression de protéines telles que la PIG3, la proline oxydase et la FDRX (ferredoxine réductase) participant ainsi à la mort cellulaire par apoptose induite lorsque les dommages cellulaires sont trop importants (Olovnikov *et al.*, 2009; Sablina *et al.*, 2005; Vousden *et al.*, 2009a; Vousden *et al.*, 2009b) (Figure 18: Illustration schématique de la variabilité des fonctions cellulaires de p53, dépendante de l'intensité du stress).

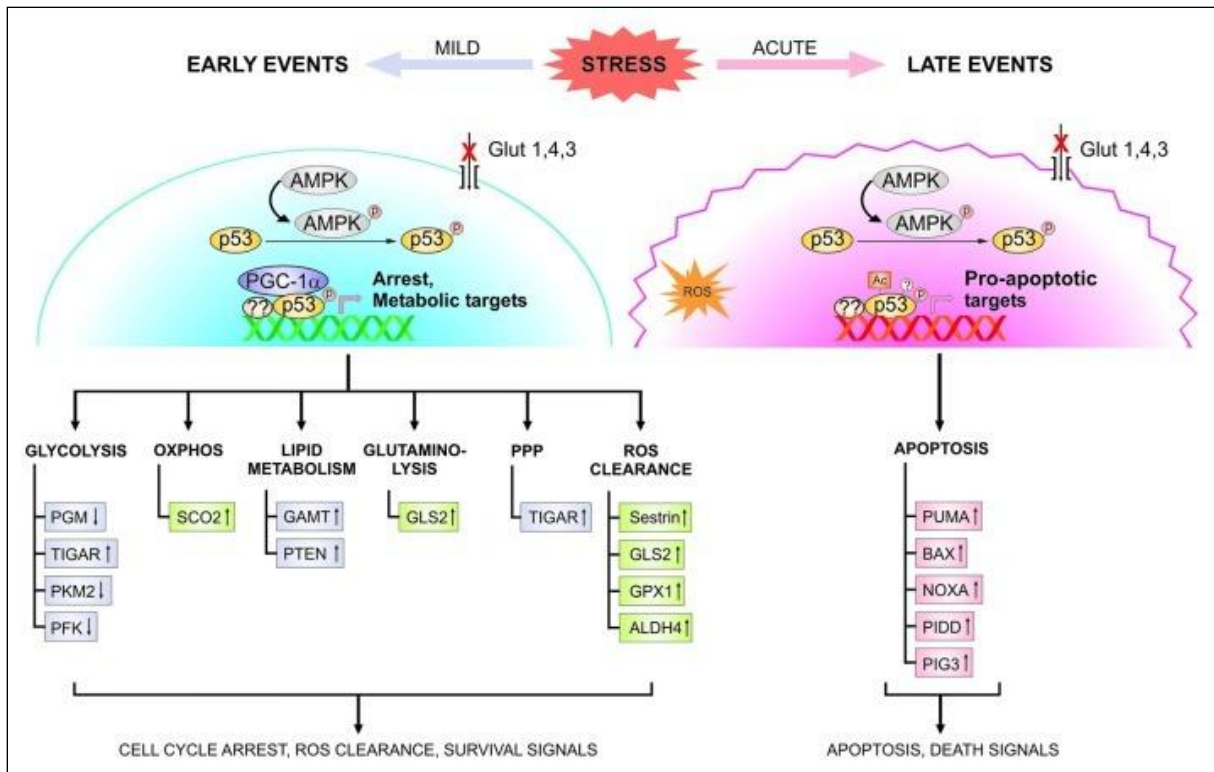


Figure 18: Illustration schématique de la variabilité des fonctions cellulaires de p53, dépendantes de l'intensité du stress. Sur ce schéma sont illustrées les conséquences d'un stress métabolique qui active p53 de manière AMPK-dépendante. Dans la partie gauche du schéma, exemple d'un stress de faible intensité et de courte durée qui active les fonctions de survie de p53 (probablement en lien avec la présence de PGC-1 α). Dans la partie droite du schéma, est représenté un stress de forte intensité et/ou de longue durée qui conduit à l'induction de l'apoptose p53-dépendante. Source: (Sen *et al.*, 2012)

2.5 Autophagie

L'autophagie est un processus d'auto-destruction intracellulaire d'organelles ou de portions cytoplasmiques par le lysosome. Il peut être bénéfique et protecteur quand il permet d'éliminer des macromolécules ou des mitochondries endommagées. Ainsi en conditions physiologiques, un niveau basal d'autophagie permet le turn-over des protéines et organelles dans les tissus. En conditions de stress, le processus autophagique peut s'intensifier pour permettre à la cellule de s'adapter en participant par exemple à la production d'énergie à partir du recyclage des produits dégradés lors d'une privation en nutriments. En revanche, cette intensification d'autophagie peut aussi représenter un mécanisme de survie pour les tumeurs exposées à un micro-environnement hypoxique ou à une chimiothérapie (Morselli *et al.*, 2009).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

Dans ce cadre, p53 jouerait un double rôle en fonction de sa localisation intracellulaire (Maiuri *et al.*, 2010). Présente au noyau, la protéine p53 induit l'expression de protéines impliquées plus ou moins directement dans l'activation de l'autophagie: DRAM (Damage-Regulated Autophagy Modulator) et DAPK1 (Death-Associated Protein Kinase 1), qui peuvent également être impliquées dans l'apoptose; et AMPK (AMP-activated protein Kinase), TSC1/2 (Tuberous Sclerosis), les sestrines et PTEN qui aboutissent à l'inactivation de mTOR, levant ainsi l'inhibition que mTOR exerce sur le processus autophagique (Maiuri *et al.*, 2010). Présente dans le cytoplasme et plutôt en condition basale, la protéine p53 semble en revanche exercer une activité inhibitrice sur l'autophagie par un mécanisme qui reste cependant à éclaircir (Tasdemir *et al.*, 2008; Vousden *et al.*, 2009b).

2.6 Angiogénèse

La protéine p53 exerce des activités anti-angiogéniques empêchant l'extension tumorale par au moins trois mécanismes (Teodoro *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2000): 1- la transactivation de facteurs anti-angiogéniques comme la TSP-1 (thrombospondine-1) (Dameron *et al.*, 1994), l'EPHA2 (ephrine récepteur A2) et le BAI1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1); 2- la transrepression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Mukhopadhyay *et al.*, 1995), le FGF2 et FGF2-BP; 3- l'inhibition des systèmes de détection de l'hypoxie en induisant la dégradation d'HIF-1 α (Ravi *et al.*, 2000).

3 Régulations de p53

Au vu de ses multiples fonctions, la protéine p53 doit être finement contrôlée pour induire une réponse cellulaire adaptée au stress cellulaire et pour éviter des désordres p53-dépendants potentiellement fatals à la cellule. Ainsi l'expression mais surtout l'activité et la stabilité de p53 sont régulées par de nombreux mécanismes au niveau transcriptionnel, traductionnel, par des modifications post-traductionnelles et des interactions avec d'autres protéines (Harris *et al.*, 2005; Vogelstein *et al.*, 2000) (Figure 19: Régulation de la protéine p53).

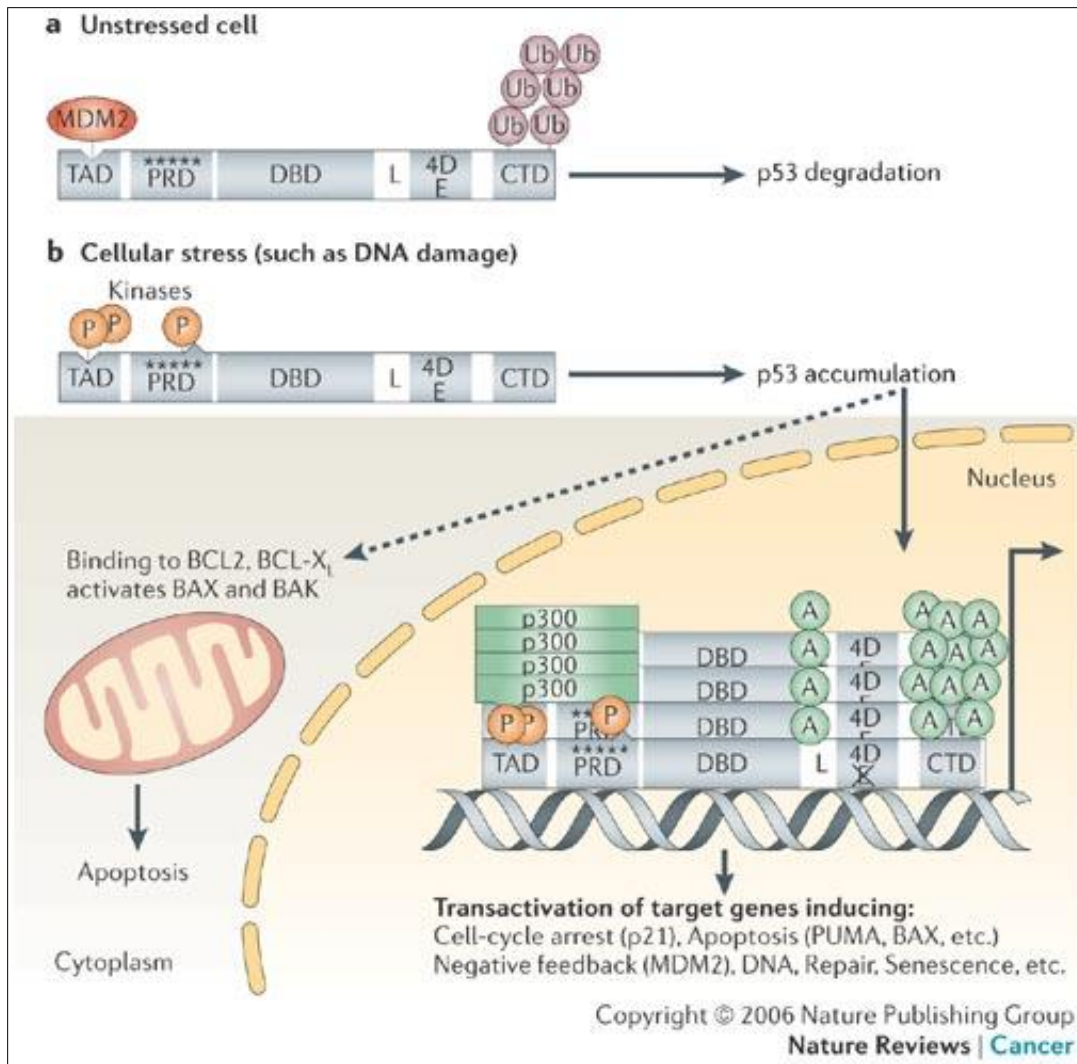


Figure 19: Régulation de la protéine p53. Source: (Toledo *et al.*, 2006)

a: en absence de stress cellulaire, p53 est principalement inactivée par MDM2 qui se fixe dans la partie N-terminale de p53 et induit une ubiquitination de lysines dans la partie C-terminale de p53 qui conduit à sa dégradation par le protéasome.

b: en condition de stress cellulaire, p53 est activée par des phosphorylations de sérines/thréonines qui empêchent la fixation de MDM2. P53 s'accumule et forme des complexes tétramériques auxquels se greffent des co-activateurs. Une fois au noyau, ces complexes induisent l'expression des gènes cibles de p53, conduisant à une réponse cellulaire adaptée à la condition de stress. P53 peut également exercer une activité pro-apoptotique par liaison directe avec des protéines mitochondriales.

Ub: lysine ubiquitinylée, P: sérine/thréonine phosphorylée, A: lysine acétylée.

3.1 Inactivation de p53 en condition normale

En condition normale, p53 est à l'état quiescent, son expression est très faible, sa demi-vie de quelques minutes seulement et sa conformation inactivée (repliement de la partie C-terminale qui inhibe le domaine central de liaison à l'ADN).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

Les mécanismes régulant sa traduction impliquent les extrémités 3'UTR et 5'UTR de l'ARNm de p53. En effet l'extrémité 3'UTR contient des séquences qui induisent une structure secondaire capable d'inhiber la traduction de p53 (Fu *et al.*, 1996). De plus, la fixation de protéines comme la nucléoline sur les parties 3' et 5'UTR inhibe la traduction de p53 (Chen *et al.*, 2012; Halaby *et al.*, 2007).

Cependant, l'expression génique et l'expression protéique de p53 n'étant pas forcément corrélée (Fu *et al.*, 1996), la quantité protéique de p53 dans la cellule est principalement déterminée par son taux de dégradation plutôt que par son taux de production.

La dégradation de p53 est sous le contrôle de la protéine MDM2, son principal régulateur. En effet, MDM2 se fixe sur la partie N-terminale de p53, bloquant ainsi le domaine de transactivation de p53 et l'éventuelle fixation de protéines co-activatrices (premier niveau d'inhibition de l'activité de p53). Cette fixation induit également un changement conformationnel de p53 empêchant sa fixation sur l'ADN (Brooks *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2011). De plus, MDM2 est capable d'ubiquitinyler des lysines dans la partie C-terminale de p53 (principalement lys370, lys372, lys373, lys381, lys382 et lys386) via son activité d'ubiquitine E3 ligase (Honda *et al.*, 1997), ce qui favorise l'export nucléaire de p53 (deuxième niveau d'inhibition de l'activité de p53). Il semblerait qu'aux concentrations physiologiques, MDM2 induise une mono-ubiquitinylation de p53 (Li *et al.*, 2003). MDM2 est également capable de recruter des E2/E3 ligases qui conduisent à une forme poly-ubiquitinylée de p53 induisant ainsi sa dégradation cytoplasmique par la machinerie protéolytique au niveau du protéasome (troisième niveau d'inhibition de l'activité de p53) (Haupt *et al.*, 1997; Hock *et al.*, 2010).

La protéine homologue de MDM2 qu'MDMX (aussi appelée MDM4) inhibe également l'activité de p53. En effet, MDMX présente une structure proche de MDM2 notamment au niveau de leur domaine N-terminal qui assure leur fixation sur le domaine N-terminal de p53 (Marine *et al.*, 2006). MDMX ne possède cependant pas d'activité d'ubiquitine ligase intrinsèque mais peut se fixer sur MDM2, via une interaction entre leurs domaines RING en C-terminal (Uldrijan *et al.*, 2007) et ainsi renforcer l'activité régulatrice de MDM2. MDMX favoriserait également l'activation de la transcription de MDM2 par p53 (Biderman *et al.*, 2012).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

De plus, d'autres ubiquitine-ligases qui favorisent la dégradation de p53 ont été décrites, dont PIRH2 (P53-Induced protein with a RING-H2 domain) (Leng *et al.*, 2003), COP1 (Constitutively Photomorphogenic 1) (Dornan *et al.*, 2004b), WWP1 (NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase) (Laine *et al.*, 2007) et CARP (Caspase8/10-Associated RING Protein) (Yang *et al.*, 2007).

D'autres protéines sont également impliquées dans l'inactivation de p53, comme la phosphatase WIP1 (Wild-type p53-Induced Phosphatase 1) en déphosphorylant p53 et certaines de ces protéines activatrices comme ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated protein) (Elias *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2008), la déacétylase SIRT1 (sirtuin1) (Lee *et al.*, 2013) et l'histone déacétylase 1 HDAC1 (qui de plus est activée par MDM2) (Benkirane *et al.*, 2010).

En outre, MDM2, PIRH2, COP1 et WIP1 sont également des cibles transcriptionnelles de p53; ce qui crée des boucles d'autorégulation négative (Lowe *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 1993), associées à des oscillations des taux protéiques de ces protéines en opposition de phase avec le taux protéique de p53 (Elias *et al.*, 2014).

3.2 Activation de p53 en condition de stress cellulaire

Trois conditions de stress cellulaires sont principalement impliquées dans l'activation de p53:

- des dommages à l'ADN, secondaires par exemple à des radiations ionisantes, qui activent la voie des « capteurs/senseurs de dommages à l'ADN » comprenant entre autres les protéines ATM et CHK2 (Checkpoint Kinase 2) lors de radiations gamma, et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein), CHK1 (Checkpoint Kinase 1) et caséine kinase-2 lors de radiations UV;
- des signaux de croissance aberrants lors de l'expression d'oncogènes comme Myc ou Ras, qui activent la protéine p14/ARF (Lin *et al.*, 2001; Zindy *et al.*, 1998), qui se lie alors à MDM2 et le séquestre dans les nucléoles inhibant ainsi son activité régulatrice (Sherr *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 1999);
- les médicaments de chimiothérapie.

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

En conditions de stress cellulaires, des voies de signalisation sont activées pour prévenir la dégradation de la protéine p53 et ainsi la stabiliser et favoriser son activité. De plus, il est également observé une activation de la traduction de p53 notamment via la fixation de protéines sur l'ARNm de p53 comme HuR (Human antigen R) et RPL26 (60S ribosomal protein L26) sur les extrémités 3' et 5'UTR (Chen *et al.*, 2012; Mazan-Mamczarz *et al.*, 2003; Takagi *et al.*, 2005).

Cependant, bien qu'une augmentation du taux protéique de p53 et de sa demi-vie intracellulaire soit importante dans l'activation de p53 (Kastan *et al.*, 1991), elle n'est pas forcément suffisante pour que p53 devienne un activateur transcriptionnel. En effet, sont nécessaires des modifications de sa conformation induisant un état activé de la protéine, résultant de modifications post-traductionnelles associées à l'interaction avec d'autres protéines.

Les modifications post-traductionnelles de p53 peuvent être de différentes natures et toucher divers acides aminés (au moins 30 acides aminés ont été rapportés comme pouvant être modifiés) en fonction de la voie d'activation et sont sous le contrôle de protéines activatrices de p53. Elles comprennent des phosphorylations de serines et thréonines qui peuvent avoir lieu sur l'ensemble de la séquence protéique (23 sites possibles) par des kinases (ATM, ATR, CHK1/2, DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase), p38 kinase, HIPK2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2)...) des acétylations (10 sites possibles) par des acétyl-transférases (p300/CBP, PCAF (p300/CBP-Associated Factor), MOF (Males absent On the First), TIP60 (Tat-Interactive Protein of 60kDa)), des neddylation, des sumoylation et des méthylation de lysines principalement dans la partie de régulation C-terminale de p53 (Toledo *et al.*, 2006) ([Figure 20](#): Panorama des modifications post-traductionnelles de p53). Ces modifications peuvent avoir diverses conséquences fonctionnelles mais globalement les phosphorylation et les acétylation exercent une fonction activatrice sur p53 en empêchant sa dégradation, favorisant sa translocation nucléaire, sa tétramérisation ou encore sa liaison à l'ADN.

Concernant par exemple la réponse à un dommage à l'ADN secondaire à des radiations gamma, la protéine kinase ATM est rapidement activée par un mécanisme de « trans-auto-phosphorylation » (Bakkenist *et al.*, 2003), ce qui conduit à la phosphorylation de la serine 15 de p53. Ce site (qui peut

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

en outre être phosphorylé par sept autres kinases) étant à côté du site de liaison de MDM2, sa modification empêche la fixation de MDM2 sur p53, stabilisant ainsi p53.

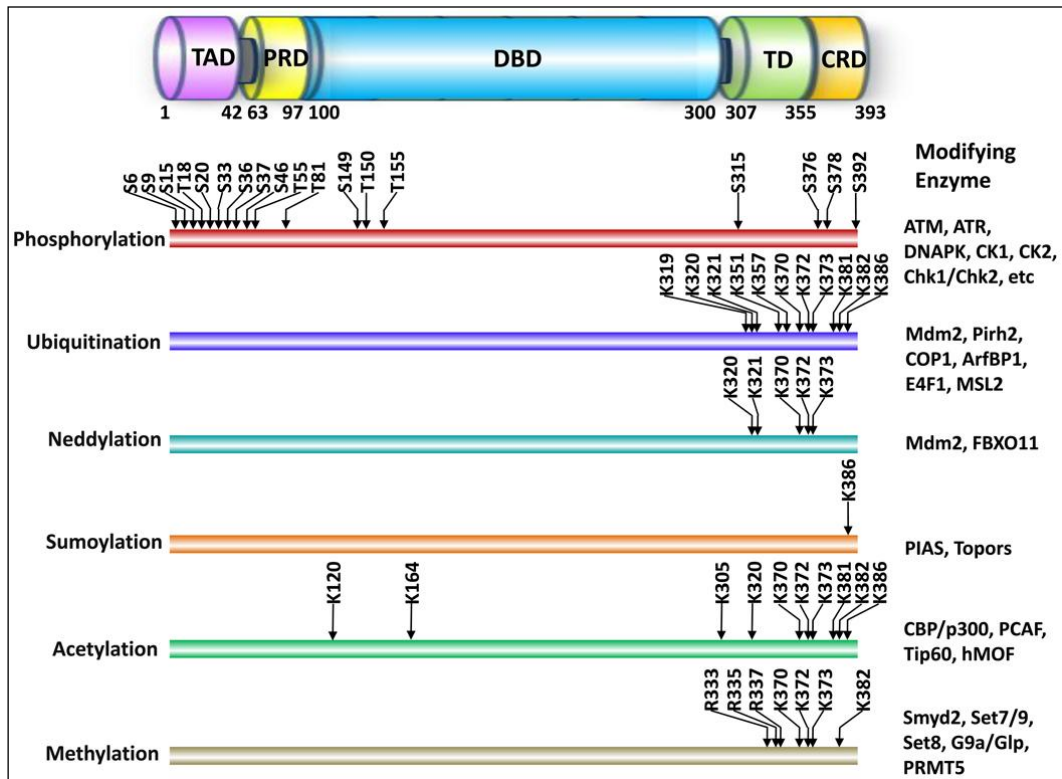


Figure 20: Panorama des modifications post-traductionnelles de p53. Source: (Dai *et al.*, 2010).

Il convient de noter que les modifications post-traductionnelles de p53 sont spécifiques d'un stress cellulaire donné, qu'un stress n'induit pas seulement une modification mais une combinaison séquentielle de modifications, qu'un même site peut être la cible de plusieurs types de modifications (aux effets variables) et qu'un même type de modification peut induire différents effets. Par exemple, la méthylation de la lysine 372 par SET9 (SET 9 méthyltransférase) (qui peut en outre être ubiquitinylée par MDM2 et acétylée par p300) induit une activation de p53; alors que la méthylation de la lysine 370 par SMYD2 (SET/MYND domain-containing methyltransferase 2) (qui peut en outre également être ubiquitinylée par MDM2 et acétylée par p300) induit une déstabilisation de p53. De même, l'ubiquitination de p53 induite majoritairement par MDM2 conduit à la dégradation de p53; alors que la poly-ubiquitination de la lysine 320 par E4F1 semble activer p53 et induire l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Le Cam *et al.*, 2006).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

De plus, les modifications post-traductionnelles de p53 peuvent permettre la liaison de co-facteurs (et *vice versa*) qui coopèrent directement avec p53 pour influencer l'expression de gènes cibles (Coutts *et al.*, 2005). Parmi les co-activateurs de p53, les protéines p300/CBP de la famille des histones acétyl-transférases peuvent interagir avec la protéine JMY (Junction-mediating and -regulatory protein); le complexe [p300/JMY] est alors recruté lors d'un stress cellulaire, se fixe sur le domaine de transactivation de p53 et conduit à l'acétylation de lysines de p53 (empêchant l'ubiquitination de ces lysines par MDM2) et à la transactivation de gènes impliqués dans l'apoptose (Shikama *et al.*, 1999). La protéine STRAP (Serine-threonine kinase receptor-associated protein) est un cofacteur qui facilite l'interaction p300-JMY (Demonacos *et al.*, 2001); alors que le cofacteur SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) empêche l'interaction p300-p53 (Kitagawa *et al.*, 2008b). La propyl-isomérase PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) est également un co-activateur de p53 en condition de stress génotoxique, en catalysant l'isomérisation de prolines dans le domaine riche en prolines de p53 en se liant à des motifs de p53 contenant des serines/thréonines phosphorylées. Ceci entraîne un changement conformationnel de p53, facilitant la fixation d'autres co-activateurs comme p300 et la dissociation de MDM2 et d'autres inhibiteurs comme iASPP (Mantovani *et al.*, 2007). Les protéines ASPP 1 et ASPP 2 (Apoptosis-stimulating of p53 protein) sont également des co-activatrices de p53 qui se lient au domaine central de liaison à l'ADN de p53 et favorisent préférentiellement la transactivation de gènes impliqués dans l'apoptose (Samuels-Lev *et al.*, 2001). Les protéines 53BP1 (p53-binding protein 1) et HZF (Haematopoietic zinc finger) peuvent également se lier au domaine central de p53 et favorisent quant à elles la transactivation de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation à l'ADN (Sugimoto *et al.*, 2006; Trigiante *et al.*, 2006). La protéine HZF est également une cible transcriptionnelle de p53, ce qui crée une boucle de rétrocontrôle positif, bloquant le cycle cellulaire le temps de la réparation du stress génotoxique (processus dans lequel intervient également la protéine 53BP1). Quand le stress se prolonge, il semble que HZF soit dégradé, ce qui favoriserait la transactivation de gènes impliqués dans l'apoptose (Das *et al.*, 2007).

Le choix de la réponse cellulaire dépendante de p53 en condition de stress dépend du type cellulaire considéré associé à son contexte environnemental, de l'état d'activation/inactivation d'autres voies de

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

signalisation intracellulaire et à la nature du signal de stress lui-même, son intensité et sa durée. Dans ce contexte, le taux de p53 actif et l'affinité avec laquelle p53 se lie à la séquence de ses gènes cibles régulent la réponse p53-dépendante. En effet, il semblerait qu'une faible quantité de p53 se lie à des sites de haute affinité impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire alors qu'une forte augmentation de p53 permet la liaison à des sites de haute affinité comme les gènes pro-apoptotiques (Chen *et al.*, 1996; Kracikova *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2005). Ces différences d'affinité peuvent dépendre de la nature de la séquence cible, la conformation de p53, les modifications post-traductionnelles de p53 et les interactions de p53 avec d'autres protéines comme ses co-activateurs qui peuvent orienter préférentiellement vers une réponse plutôt qu'une autre et ainsi réguler le destin de la cellule (Murray-Zmijewski *et al.*, 2008). Il est également important de prendre en compte l'aspect temporel, dynamique et évolutif des processus d'activation et de régulation de p53 (Batchelor *et al.*, 2011; Puszynski *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b).

3.3 Impact de la localisation subcellulaire de p53

La localisation subcellulaire régie l'activité de p53 et est conditionnée par l'activation ou l'inhibition de p53, dépendante de l'état quiescent ou altéré de la cellule (Ferecatu *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2001).

Une fois activée en condition de stress cellulaire, la translocation nucléaire de p53 entraîne une rapide accumulation de p53 dans le noyau, permettant à p53 d'exercer son activité principale de facteur de transcription en se liant spécifiquement à certains promoteurs de gènes cibles via sa structure tétramérique. En outre, la cinétique de réponse fluctue en fonction des gènes cibles et des conditions de stress. En effet, certains gènes cibles sont transcrits rapidement alors que d'autres le sont plus tardivement et certains peuvent même être activés dans un premier temps et réprimés ensuite (réponse biphasique).

La localisation cytoplasmique de p53 correspond principalement à sa forme inactivée (poly-ubiquitinylée), précédant sa dégradation par la sous-unité 26S du protéasome. Cependant certaines études ont rapporté que la protéine p53 intra-cytoplasmique pourrait être associée au cytosquelette cellulaire, en particulier aux micro-tubules et aux filaments d'actine (Giannakakou *et al.*, 2000;

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

Katsumoto *et al.*, 1995; Metcalfe *et al.*, 1999). De plus, en dehors du noyau, p53 peut également avoir une activité au niveau des mitochondries. Il semblerait que la mono-ubiquitination de p53 favorise sa translocation mitochondriale (Marchenko *et al.*, 2007) et qu'une fois arrivée au niveau de la membrane externe mitochondriale, p53 soit déubiquitinylée par la protéine HAUSP (Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease) pour qu'elle puisse former des complexes protéiques avec les protéines de la famille BCL-2, favorisant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose (Erster *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003; Vaseva *et al.*, 2009). Par ailleurs, il semblerait que les faibles taux intracellulaires de p53 en absence de stress cellulaire jouent un rôle dans la physiologie normale de la mitochondrie, via la localisation de p53 au niveau de l'espace inter-membranaire (et à la matrice mitochondriale dans une moindre mesure), favorisant notamment l'assemblage du complexe ATP-synthase (Bergeaud *et al.*, 2013).

En outre, l'import-export nucléaire de p53 est un processus actif faisant intervenir ses séquences d'import et d'export nucléaire, associées à l'activité de protéines comme MDM2 qui favorise son export nucléaire, les protéines Cullin-7, PARC (p53-associated parkin-like cytoplasmic protein), Mot2 et WWP1 qui séquestrent p53 dans le cytoplasme, la polymérase PARP1 (Poly [ADP-ribose] polymerase 1) qui prévient l'interaction entre p53 et le récepteur d'export nucléaire CRM1 (Chromosome region maintenance protein 1 ou Exportin-1) ce qui favorise son accumulation nucléaire et l'importine α qui favorise son import nucléaire (Kanai *et al.*, 2007; Komlodi-Pasztor *et al.*, 2009; Laine *et al.*, 2007; O'Brate *et al.*, 2003).

4 P53 dans la cancérogénèse

Le processus de cancérogénèse fait intervenir deux éléments essentiels: l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs et le gain d'activités oncogéniques. Dans ce contexte, la protéine p53 joue un rôle primordial puisque elle est inactivée dans la majorité des cancers humains: par mutations directes sur le gène *TP53*, ou par inactivation fonctionnelle par altération des voies effectrices et/ou régulatrices de p53. Dans un but thérapeutique, il est intéressant de réactiver la voie de p53 « sauvage » aux propriétés pro-apoptotiques et/ou d'éliminer la protéine p53 mutée afin d'enrayer l'hyper-prolifération des cellules cancéreuses et de provoquer leur mort par apoptose.

4.1 Inactivation par mutations du gène *TP53* et ses répercussions dans la cancérogénèse

4.1.1 Mutations sur le gène *TP53*

Le gène *TP53* est un des gènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains. En effet, environ 50% des cancers présentent des mutations somatiques sur le gène *TP53*, pour lesquelles 73% d'entre elles sont des mutations ponctuelles (substitution d'un acide aminé) de type « faux-sens » (source: IARC *TP53* Database, Novembre 2013). Elles conduisent à la production d'une protéine p53 mutée stable, mécanisme original d'inactivation, puisque la plupart des mutations des autres gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers conduisent plutôt à l'absence de protéine. Il a été décrit des milliers de mutations avec une fréquence variable selon les cancers (Edlund *et al.*, 2012; Petitjean *et al.*, 2007; Soussi *et al.*, 2005) (Figure 21: Prévalence des mutations somatiques du gène *TP53* dans différents cancers). Les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni présentent des mutations germinales sur le gène *TP53* (héritage d'un allèle muté) qui les prédisposent au développement de cancer (Malkin, 2011).

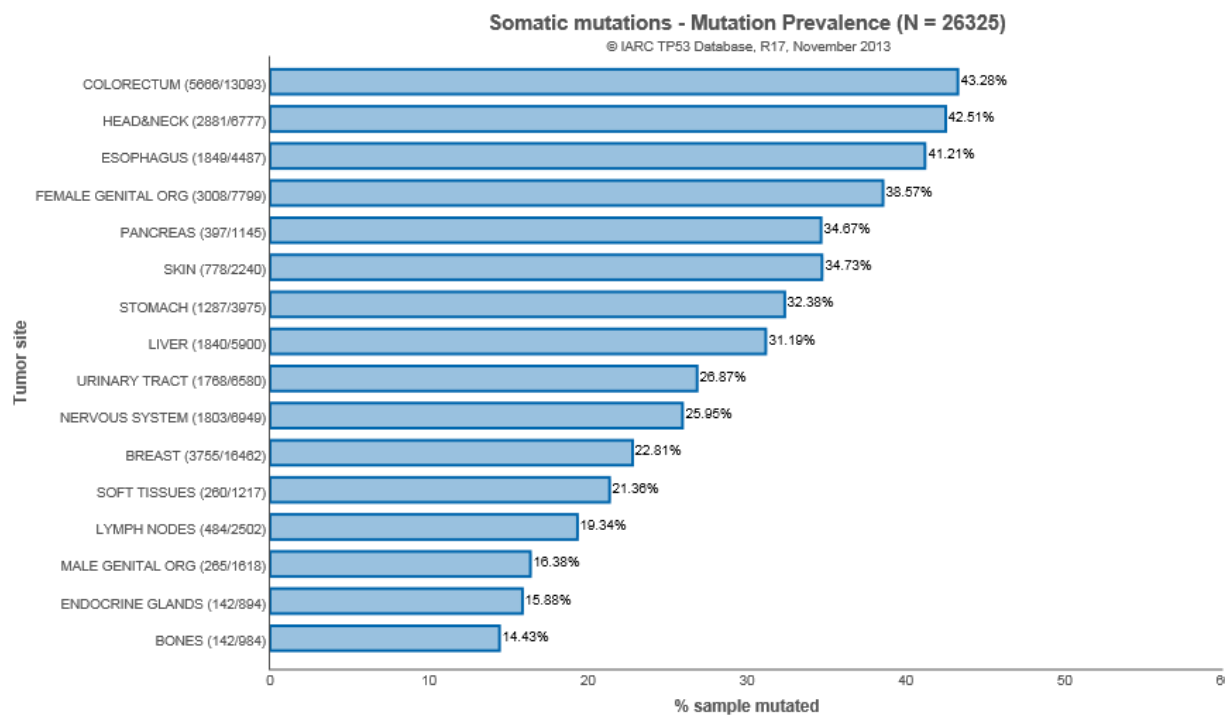


Figure 21: Prévalence des mutations somatiques du gène *TP53* dans différents cancers.

Source: <http://p53.iarc.fr/>

Dans la majorité des cas, les mutations concernent le domaine central de liaison à l'ADN de p53 contenant les six sites les plus fréquemment mutés, appelés « *hot spots* » de mutations: acides aminés 175, 245, 248, 249, 273 et 282 (Figure 22: Spectre des mutations sur le gène *TP53* dans les cancers humains). Les acides aminés peuvent se répartir en deux groupes impliqués directement dans les conséquences phénotypiques des mutations affectant ces résidus: un premier groupe engagé dans le maintien de la structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN, on parle alors de « mutants conformationnels ou structurels », et un second groupe impliqué dans le contact direct avec l'ADN, on parle alors de « mutants de contact ».

En clinique, les mutations sur le gène *TP53* sont souvent associées à un mauvais pronostic, une survie diminuée et une résistance aux chimio- et radio-thérapies (Robles *et al.*, 2010).

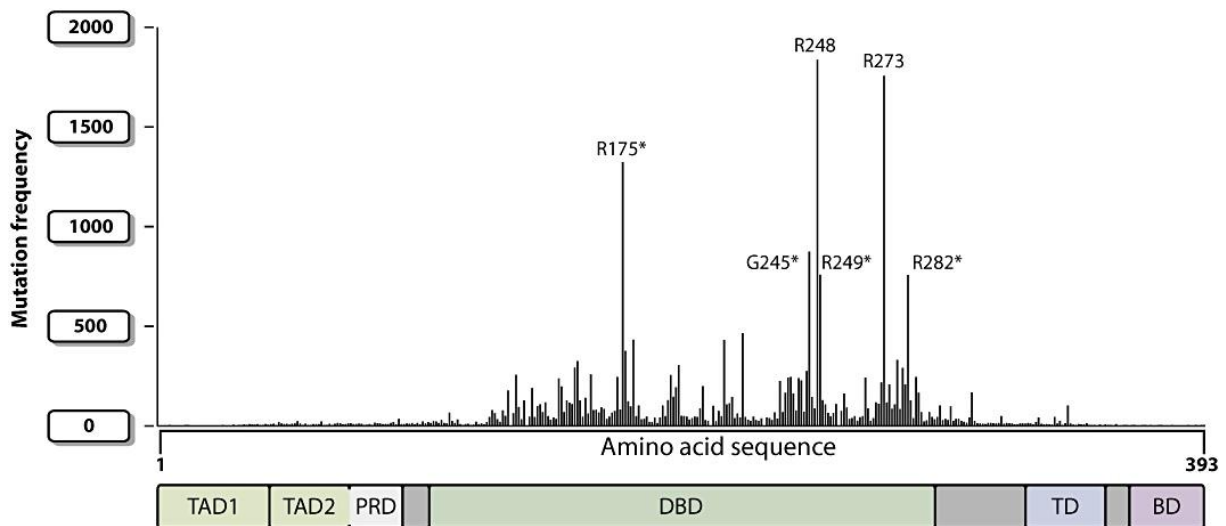


Figure 22: Spectre des mutations sur le gène *TP53* dans les cancers humains.

*: sites mutants conformationnels. Source: (Essmann *et al.*, 2012)

4.1.2 Perte des fonctions physiologiques de la protéine p53

P53 étant un facteur de transcription, une mutation dans le domaine central de liaison à l'ADN de p53 induit une perte de liaison à l'ADN (soit absence totale ou partielle de liaison, soit diminution de l'affinité de liaison), rendant la protéine p53 inactive (Kato *et al.*, 2003), l'empêchant ainsi de transactiver ou de transréprimer ses gènes cibles « classiques », notamment ceux impliqués dans l'apoptose (Pan *et al.*, 2000). Par conséquent, cette perte de fonction de p53 participe à l'état de résistance à l'apoptose caractéristique des cellules cancéreuses. Une modification de la conformation

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

de la protéine p53 mutée contribue également au processus de perte de fonctions physiologiques de p53. En effet, plus une mutation perturbe la conformation de la protéine sauvage, moins les activités physiologiques de la protéine p53 seront maintenues.

Une mutation du gène *TP53* peut également entraîner une dérégulation des modifications post-traductionnelles et/ou des interactions de p53 avec certains de ses co-facteurs nécessaires à l'activation de p53, empêchant une réponse p53-dépendante adaptée au stress cellulaire (Dai *et al.*, 2010). Par exemple, l'arginine 181 étant le site de fixation de ASPP1, une substitution de l'arginine 181 par une lysine ou une leucine empêche l'induction de l'apoptose p53-dépendante, sans altérer néanmoins la fonction de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire (Trigiante *et al.*, 2006).

4.1.3 Activité dominante négative de la protéine p53 mutée

En général, les deux allèles doivent être mutés pour rendre inactive la protéine et donc favoriser la cancérogénèse (théorie du double hit); cependant la majorité des cancers humains sont constitués de cellules cancéreuses hétérozygotes co-exprimant les allèles tant mutés que sauvages du gène *TP53*. L'élément déclencheur de l'inactivation de la copie sauvage est alors l'effet dominant négatif qu'exerce la protéine p53 mutée. En effet, la protéine mutée inactive la protéine sauvage en se liant à celle-ci pour former des complexes hétéro-tétramériques dans lesquels la protéine sauvage adopte une conformation spatiale mutante (Chene, 1998; Milner *et al.*, 1991). De plus, il est bien souvent observé une surexpression nucléaire de la protéine p53 mutée dans les cellules cancéreuses, étant donné qu'elle échappe à la régulation négative médiée par MDM2.

Par ailleurs, la protéine p53 mutée exerce une activité dominante négative sur les autres membres de la famille de p53, que sont p63 et p73. En effet, en se liant à celles-ci, elle inhibe leurs fonctions (Li *et al.*, 2007).

4.1.4 Gain de fonctions oncogéniques de la protéine p53 mutée

Les mutations dans le domaine central de liaison à l'ADN peuvent conduire à une spécificité de séquence de liaison à l'ADN différente de la protéine sauvage (points de contact avec l'ADN différents) ou à une modification de la conformation de la protéine p53 mutée qui altèrent par

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

conséquent sa liaison à l'ADN en induisant sa fixation sur des promoteurs différents de ceux « classiquement » ciblés par la protéine sauvage (Garritano *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2004; Rolley *et al.*, 1995). Il semblerait également que la protéine p53 mutée pourrait interagir avec d'autres facteurs de transcription qui favoriseraient sa fixation sur certaines séquences (Di Agostino *et al.*, 2006; Sampath *et al.*, 2001). Dans tous les cas, l'expression de la protéine p53 mutée peut activer l'expression de gènes favorisant la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogénèse et la résistance aux chimiothérapies (PCNA, EGFR, VEGF, NFKB2 (Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit), c-myc, MDR-1 (Multidrug resistance protein 1)...) (Chin *et al.*, 1992; Frazier *et al.*, 1998; Ludes-Meyers *et al.*, 1996; Scian *et al.*, 2005) et inhiber l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose comme CD95 (Zalcenstein *et al.*, 2003), conférant aux cellules un avantage sélectif favorisant leur potentiel oncogénique (Scian *et al.*, 2004; Sigal *et al.*, 2000; van Oijen *et al.*, 2000; Weisz *et al.*, 2007).

Parallèlement, la protéine p53 mutée augmente l'instabilité génomique, favorable à la cancérogénèse (Murphy *et al.*, 2000; Overholtzer *et al.*, 2003). En effet, la réponse aux dommages à l'ADN est altérée en présence d'une protéine p53 mutée, puisqu'en plus de ne pas induire l'expression de protéines impliquées dans la réparation à l'ADN, la protéine p53 mutée empêche l'activation d'ATM lors de dommages à l'ADN en interagissant avec la protéine Mre11 du complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) nécessaire à l'initiation de la réponse aux dommages à l'ADN (Song *et al.*, 2007), favorisant ainsi l'installation de mutations potentiellement pro-cancérogènes.

4.2 Autres types d'inactivations de p53: inactivations fonctionnelles

4.2.1 Mutations sur les protéines activatrices de p53

Des mutations sur le gène *ATM* ainsi que des délétions du locus 11q22.3 (perte du gène *ATM*) ont été rapportées chez environ 20% des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (Bullrich *et al.*, 1999; Stankovic *et al.*, 2014; Starostik *et al.*, 1998). Ainsi l'inactivation de la protéine ATM (lors d'une altération bi-allélique ou via l'activité dominante négative d'une mutation) provoque une réponse aux dommages à l'ADN défectueuse incluant une perte d'activation de p53. Les patients leucémiques qui présentent en outre une délétion du locus 17q13.1 (perte du gène *TP53*) ont un très mauvais pronostic (Greipp *et al.*, 2013). De plus, les patients atteints d'ataxie télangiectasie présentent

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

des mutations germinales d'*ATM* (héritage de deux allèles mutés) qui les prédisposent au développement de tumeurs lymphoïdes.

Des mutations germinales sur le gène *CHEK2* ont été rapportées chez quelques patients atteints du syndrome Li-Fraumeni, suggérant que ce gène codant pour la protéine CHK2 activatrice de p53 lors de dommages à l'ADN est une alternative aux mutations touchant le gène *TP53* chez 75% des patients prédisposant au syndrome Li-Fraumeni (Bell *et al.*, 1999). Depuis la description de ces mutations dans le syndrome Li-Fraumeni, le gène *CHEK2* a été décrit comme un gène de susceptibilité de développement de cancer dans plusieurs organes (sein, prostate, colon...), qui semblerait agir en synergie avec d'autres gènes ou d'autres facteurs pour induire le développement de cancer (Antoni *et al.*, 2007; Cybulski *et al.*, 2004).

4.2.2 Surexpression de protéines régulatrices de p53

Une accumulation anormale de MDM2 et/ou de MDMX est observée dans environ 1/3 des cancers (dans lesquels *TP53* n'est pas muté en général), conduisant à une dégradation excessive de p53, l'empêchant d'exercer ses activités de suppresseur de tumeur (Li *et al.*, 2013; Manfredi, 2010). Les types de cancers les plus fréquemment touchés par cette altération sont les cancers des tissus mous et les ostéosarcomes (Oliner *et al.*, 1992; Patterson *et al.*, 1997). Cette accumulation peut être due à une amplification génique, une augmentation de la transcription et/ou une augmentation de la traduction de MDM2 ou MDMX (Bond *et al.*, 2004; Danovi *et al.*, 2004; Momand *et al.*, 1998).

Une diminution de l'expression de la protéine p14/ARF, observée particulièrement dans certains cancers où p53 n'est pas muté, conduit à une perte de la régulation négative qu'exerce p14/ARF sur MDM2, donc à une hyperactivation de MDM2 et par conséquent à une dégradation excessive de p53. Cette diminution d'expression de p14/ARF peut être la conséquence d'une délétion du gène *p14/ARF* (Iwato *et al.*, 2000) ou d'une inactivation épigénétique (par exemple, une hyper-méthylation du promoteur de *p14/ARF* dans certains cancers colorectaux inhibe la transcription de p14/ARF (Esteller *et al.*, 2000)).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

Une augmentation de l'expression de certaines ubiquitine-ligases peuvent également inactiver p53 en favorisant sa dégradation: PIRH2 dans les cancers du poumon (Duan *et al.*, 2004), COP1 dans les adénocarcinomes du sein et des ovaires (Dornan *et al.*, 2004a) et WWP1 dans les cancers du sein et de la prostate (Chen *et al.*, 2007a; Chen *et al.*, 2007b).

Des altérations concernant les protéines responsables des modifications post-traductionnelles de p53 peuvent également interférer avec le bon fonctionnement de p53 et favoriser la cancérogénèse. Par exemple, une surexpression de la déacétylase SIRT1 est observée dans plusieurs cancers comme la leucémie myéloïde aigue (Bradbury *et al.*, 2005), le cancer de la prostate (Huffman *et al.*, 2007) et le mélanome (Wilking *et al.*, 2014).

En parallèle de la surexpression de certaines protéines régulatrices de p53, certains co-facteurs activateurs de p53 peuvent faire défaut dans certains cancers. Par exemple, une diminution de l'expression (par inactivation épigénétique) d'ASPP 1 et 2 impliqués dans l'apoptose ou une augmentation de l'expression de leur inhibiteur iASPP ont été observées dans le cancer du sein et la leucémie lymphoblastique aigüe (Trigiante *et al.*, 2006).

4.2.3 Interactions de p53 avec des protéines virales ou mutées

La liaison de p53 avec certaines protéines virales telles que la protéine E6 du papillomavirus humain (HPV16 ou18) ou l'antigène LT du virus simien 40 (SV40) empêche p53 d'être fonctionnellement active notamment en favorisant sa dégradation (Bernard *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2009; Munger *et al.*, 1992; Scheffner *et al.*, 1990).

Le facteur transcriptionnel WT1 (Wilms tumor 1) muté, impliqué dans le développement de tumeur rénale de Wilms (10% des cancers pédiatriques), intéragit avec la protéine p53 (Maheswaran *et al.*, 1993) et exerce secondairement un effet dominant négatif sur l'activité de p53 (Busch *et al.*, 2014).

4.3 Thérapies anti-cancéreuses ciblant p53

L'importance de la voie de p53 a suscité le développement de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses visant à réactiver p53, par des approches translationnelles ciblant et s'adaptant aux mécanismes d'inactivation de p53 décrits dans les cancers (Essmann *et al.*, 2012; Lane *et al.*, 2010;

Stegh, 2012). Ainsi plusieurs thérapies anti-cancéreuses, actuellement à l'étude ou déjà utilisées en clinique pour quelques unes, sont proposées dans le but de diminuer le volume des tumeurs ou du moins de stopper ou ralentir leur progression (Figure 23: Stratégies thérapeutiques ciblant la voie de la protéine p53). Une distinction dans les thérapies ciblant p53 est faite selon l'expression par la tumeur de la forme mutée ou sauvage de p53: la thérapie génique et les molécules restaurant les fonctions de p53 pour la première catégorie, et les molécules inhibitrices de la dégradation de p53 pour la seconde catégorie.

4.3.1 Thérapie génique

La thérapie génique propose de restaurer les fonctions d'une protéine p53 sauvage dans une tumeur où p53 est mutée par injection d'adénovirus recombinant contenant le gène *TP53* sauvage (rAd-p53). L'emploi d'un vecteur de type adénovirus Ad5 non répliquatif par injection intra-tumorale permet de délivrer le gène *TP53* au sein des cellules tumorales sans intégration dans le génome de la cellule infectée, associée à une réaction inflammatoire locale qui favorise la lyse tumorale. Le potentiel clinique de ce type de thérapie a été testé avec deux produits similaires: Gendicine® en Chine et Advexin® en occident. Au vu des résultats bénéfiques apportés par l'injection intra-tumorale de la Gendicine®, ce produit a été approuvé en Chine en octobre 2003 (devenant le premier produit de thérapie génique approuvé dans le monde pour le traitement du cancer) en combinaison d'une radiothérapie dans le traitement des carcinomes de la tête et du cou (Peng, 2005). Il a été et est également testé dans d'autres types de cancers, comme le cancer des ovaires, des poumons, du nasopharynx, du foie... ainsi que chez des patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, avec des résultats controversés qui n'ont pas permis pour l'heure aux agences réglementaires occidentales de statuer quant au rapport bénéfices/risques de ces molécules (Pan *et al.*, 2009; Stegh, 2012; Yang *et al.*, 2010; Zeimet *et al.*, 2003).

Une alternative pourrait être la virothérapie oncolytique qui vise à utiliser des adénovirus répliquatifs conditionnels qui se répliquent dans et lysent spécifiquement les cellules tumorales déficientes en p53 (Bischoff *et al.*, 1996). Par exemple, Onyx-015 est un adénovirus où le gène codant pour la protéine E1B inhibitrice de p53 a été délété, et qui a été testé entre autres dans les carcinomes de la tête et du

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

cou (Khuri *et al.*, 2000; Nemunaitis *et al.*, 2001; Ries *et al.*, 2002). Un adénovirus similaire à l'Onyx-015 a été approuvé en Chine en novembre 2005 dans le traitement combiné des cancers du nasopharynx avancés: le H101 Oncorine® (déléte pour la protéine E1B et un segment de la protéine E3B) (Garber, 2006).

4.3.2 Vaccination

Etant donné que la protéine p53 mutée est fortement exprimée dans les cancers, p53 est une cible antigénique intéressante dans l'optique d'une immunothérapie anti-cancéreuse (Chada *et al.*, 2003). Ainsi il a été développé un vaccin contenant un long peptide p53 de synthèse (p53-SLP) ainsi qu'un vaccin contenant des cellules dendritiques autologues transfectées avec le gène *TP53* sauvage (INGN-225) en vue d'induire une réponse immunitaire spécifiquement contre p53 afin d'éliminer les cellules tumorales surexprimant p53. Ces deux produits sont actuellement en cours d'études cliniques respectivement dans le traitement du cancer colorectal et le traitement du cancer du poumon (Chiappori *et al.*, 2010; Speetjens *et al.*, 2009).

4.3.3 Molécules restaurant les fonctions de p53

Grâce à une meilleure compréhension (toujours en pleine expansion !) de la structure et de la régulation de p53 à l'état sauvage et à l'état muté, de nouvelles molécules ont été développées dans le but de restaurer les fonctions « sauvages » de suppresseur de tumeur des protéines p53 mutées en corrigeant notamment leur conformation (Wiman, 2010). Ainsi les molécules PRIMA-1 (P53 Reactivation and Induction of Massive Apoptosis-1), MIRA-3 (Mutant p53 reactivation and Induction of Rapid Apoptosis-3) et STIMA-1 (SH group Targeting and Induction of Massive Apoptosis) interagissent avec le domaine de liaison à l'ADN de p53 (via notamment des modifications thiols) et restaurent son activité transcriptionnelle, induisant l'apoptose et inhibant ainsi la croissance de cellules tumorales mutées p53 (Bykov *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2008; Zache *et al.*, 2008). Un composé analogue de PRIMA-1, l'APR-246, est actuellement en cours d'études cliniques dans le cancer des ovaires.

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

D'autres molécules ciblant spécifiquement certains mutants (et leur altération structurale associée) sont également à l'étude, incluant entre autres: le PhiKan083 qui stabilise le mutant Y220C (Boeckler *et al.*, 2008), la molécule RETRA qui cible le mutant R273H (Kravchenko *et al.*, 2008), le WR1065 qui restaure la conformation du mutant V272M pour induire un arrêt du cycle cellulaire (North *et al.*, 2002) et le p53R3 qui restaure la liaison à l'ADN des mutants R175H et R273H et induit une apoptose (Weinmann *et al.*, 2008).

4.3.4 Molécules inhibitrices de la dégradation de p53

Dans les cancers où le gène *TP53* n'est pas muté, nous avons vu qu'une accumulation de MDM2 peut inactiver p53. Il a donc été développé trois principales catégories de molécules appelées « inhibitrices de MDM2 » permettant à la protéine p53 d'échapper à l'action inhibitrice de MDM2 réactivant ainsi la voie de p53: des molécules ciblant MDM2 dans l'interaction p53-MDM2, des molécules ciblant p53 dans l'interaction p53-MDM2 et des molécules inhibitrices de l'activité de MDM2 (Yuan *et al.*, 2011).

L'interaction entre p53 et MDM2 fait intervenir quatre acides aminés (Phe19, Leu22, Trp23 et Leu26) d'une hélice α dans le premier domaine de transactivation N-terminal de p53 qui se lie à une poche hydrophobe dans la partie N-terminale de MDM2 (Kussie *et al.*, 1996). Ainsi la première catégorie de molécules comprend des composés capables de se loger dans cette poche hydrophobe exerçant donc une activité d'antagoniste compétitif (Li *et al.*, 2013; Vassilev, 2007). Parmi ces molécules, celles qui présentent la meilleure affinité et spécificité font partie des familles chimiques des cis-imidazolines pour les composés Nutlins (Vassilev, 2004) dont le RO5045337 est actuellement en cours d'études cliniques (Ray-Coquard *et al.*, 2012), des benzodiazépinediones pour les composés TDP (Grasberger *et al.*, 2005; Koblisch *et al.*, 2006) et des spiro-oxindoles pour les composés MI-219, MI-319 et MI-773 actuellement en cours d'études cliniques (Ding *et al.*, 2006; Mohammad *et al.*, 2009). L'utilisation de « petits peptides modifiés (stapled peptides) », comme les peptides SAH-p53 ou ATSP-7041 qui miment l'hélice α de p53, stabilisés par des molécules hydrocarbonées permettant leur application comme potentiel médicament, est également une approche proposée pour antagoniser l'interaction p53-MDM2 (Bernal *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2013).

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

La deuxième catégorie de molécules inhibitrices de MDM2, comprenant la molécule RITA (Reactivation of p53 et Induction of Tumoral cells Apoptosis), se lie à p53 directement sur le site de liaison de MDM2, protégeant p53 de la fixation de MDM2 (Issaeva *et al.*, 2004). Le mécanisme d'action exacte de RITA reste cependant encore à élucider puisqu'il semblerait qu'elle pourrait également activer p53 indépendamment de son interaction avec le complexe p53-MDM2 (Saha *et al.*, 2012; Weilbacher *et al.*, 2014).

La troisième catégorie de molécules cible l'activité de MDM2 impliquée dans la dégradation de p53 par le protéasome et comprend les composés HLI98 qui inhibe l'activité E3 ubiquitine-ligase de MDM2 (Yang *et al.*, 2005b) et le serdementan (JNJ-26854165), actuellement en cours d'études cliniques, qui inhibe la liaison du complexe p53-MDM2 au protéasome (Tabernero *et al.*, 2011).

Etant donné qu'une surexpression de MDMX peut également participer à la dégradation excessive de p53 dans certains cancers et que la poche de liaison de p53 sur MDMX n'est pas la même que celle de MDM2, des « inhibiteurs de MDMX » ont également été développés, dont le SJ-172550 qui se fixe sur MDMX et donc empêche sa liaison à p53 (Bista *et al.*, 2012) et le XI-006 qui bloque la transcription de MDMX (Wang *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a été développé des molécules activatrices de p53 qui ciblent certains régulateurs de p53 (qui peuvent en outre agir sur d'autres protéines), comme la tenovine un inhibiteur des déacétylases SIRT1 et SIRT2 (Lain *et al.*, 2008) ou la leptomycine-B qui inhibe l'export nucléaire de p53 en bloquant CRM1 (Mutka *et al.*, 2009).

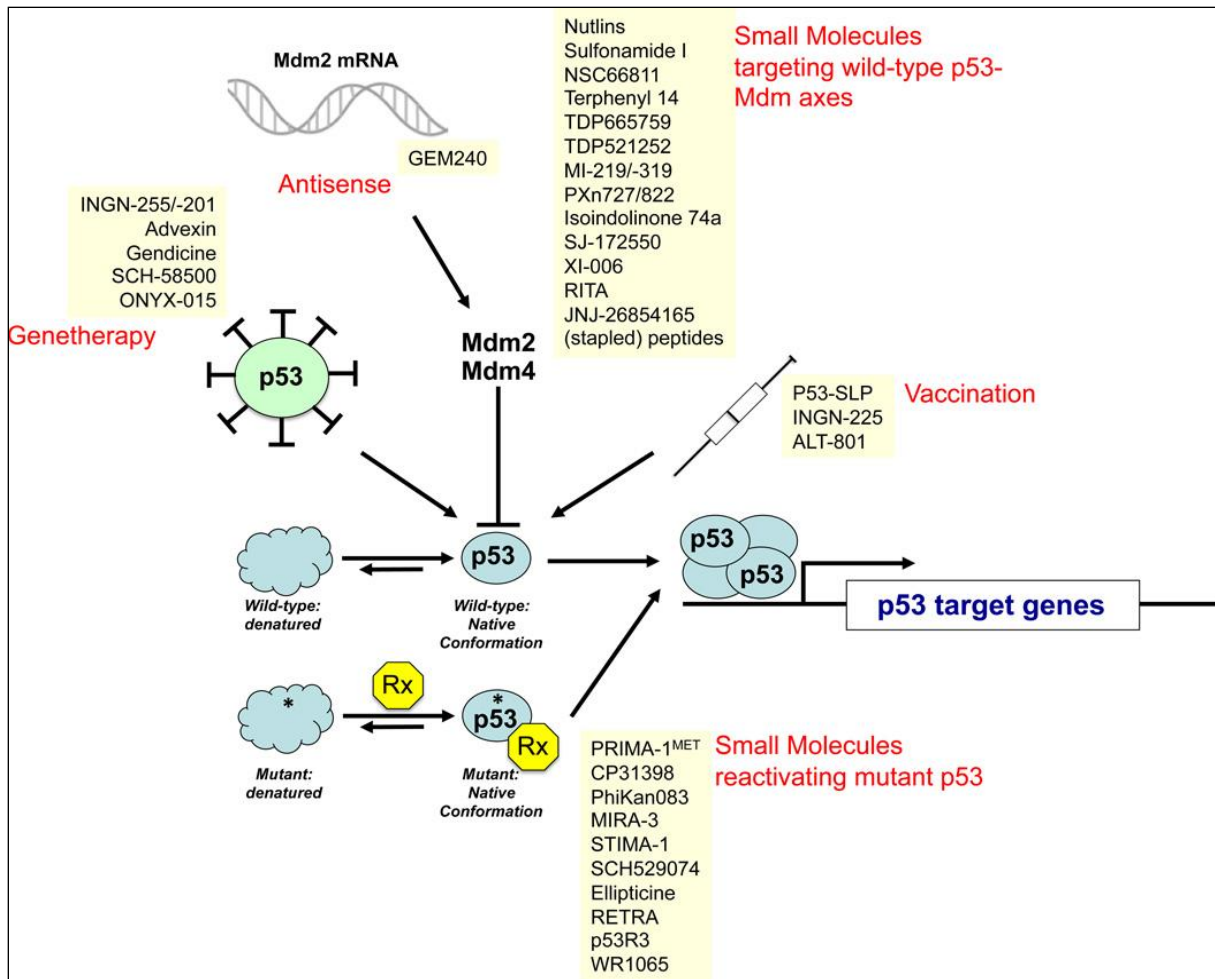


Figure 23: Stratégies thérapeutiques ciblant la voie de la protéine p53. Source: (Stegh, 2012)

4.3.5 Inhibiteur de p53

Suite aux traitements anti-cancéreux par chimio- et/ou radio-thérapies, l'activation de p53 dans les cellules tumorales est bénéfique puisqu'elle conduit à la mort de la cellule (but recherché des traitements anti-cancéreux); cependant l'activation de p53 dans les cellules saines adjacentes ou du corps entier (si le traitement est systémique) cause d'importants effets indésirables tels qu'une anémie, une lymphopénie, des problèmes intestinaux, une alopecie, une asthénie... Ainsi l'équipe de Komarova et Gudkov a émis l'hypothèse que la suppression pharmacologique de p53 pourrait être utilisée pour réduire ces effets indésirables (Gudkov *et al.*, 2007; Komarova *et al.*, 1998). Ils ont donc développé une petite molécule inhibitrice de p53, le pifithrin- α (PFT), qui protège les cellules des radiations. Comme les effets du PFT sont dépendants de p53 (actif que dans les cellules p53 +), le PFT n'affecte pas la sensibilité aux traitements anti-cancéreux des cellules tumorales déficientes en p53

Introduction : La protéine p53 « suppresseur de tumeur »

(Komarov *et al.*, 1999). Le mécanisme d'action du PFT passe par une inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53 en diminuant son accumulation nucléaire et sa liaison à l'ADN, associée à une diminution de l'expression de certaines cibles transcriptionnelles de p53 comme p21 et BAX (Culmsee *et al.*, 2001; Proietti De Santis *et al.*, 2003). Cependant, le mécanisme d'action exact du PFT reste encore à éclaircir puisque dans certaines études son action pourrait également être dépendante de son effet agoniste sur les récepteurs aryl hydrocarbène (AhR) (Hoagland *et al.*, 2005) et qu'il pourrait aussi inactiver les voies du choc thermique et des récepteurs glucocorticoïdes (Komarova *et al.*, 2003).

Objectifs

L'émergence du concept de phénotype « pseudo-tumoral » dans l'HTAP ces dernières années révèle un tournant dans la compréhension de la physiopathologie et dans l'approche thérapeutique de l'HTAP. Cette notion, qui intègre plusieurs mécanismes, permet l'apparition de nouvelles idées et hypothèses en rapprochant les caractéristiques d'ores et déjà observées dans l'HTAP et les processus décrits dans le développement tumoral.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à une importante voie largement décrite comme inactivée au cours du développement tumoral: la voie de la protéine p53. Nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait également jouer un rôle important dans le développement de l'HTAP. Au vu des résultats préliminaires publiés par quelques équipes (Mizuno *et al.*, 2011; Mouraret *et al.*, 2013) et similairement au processus tumoral, nous avons proposé que la voie de p53 pourrait être inactivée dans l'HTAP.

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

1. Déterminer le rôle de la voie de la protéine p53 au cours du développement de l'HTAP, au moyen d'une cinétique d'étude réalisée grâce à un modèle *in vivo* d'induction d'HTAP (traitement de rats par la monocrotaline).
2. Analyser les conséquences de l'inactivation pharmacologique de p53 par le pifitrin- α (PFT) sur le développement de l'HTAP dans un modèle *in vivo*.
3. Etablir l'implication de la voie de la protéine p53 dans l'HTAP idiopathique (HTAPi) humaine, plus spécifiquement au niveau des CML-AP qui sont particulièrement proliférantes dans l'HTAP. Cet objectif a été déterminé en condition basale: CML-AP HTAPi *versus* CML-AP contrôles. La réponse à des stress cellulaires activateurs de p53 a également été examinée dans ces deux types cellulaires.

4. Explorer l'intérêt thérapeutique de la Nutlin-3a *in vitro*, un activateur de p53 qui a d'ores et déjà montré des résultats prometteurs dans des modèles *in vivo* d'HTAP (Mouraret *et al.*, 2013).
5. Etudier le rôle d'une autre protéine de la famille de p53, la protéine p73, dans l'HTAP*i* humaine.

Méthodologie

Echantillons humains et culture cellulaire

1 Patients

Les recherches ont été effectuées sur des poumons de patients atteints d'HTAP idiopathique (HTAPi), obtenus lors de leur transplantation pulmonaire (ou cardio-pulmonaire) réalisée au Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France) par le Pr. Dartevelle ou le Pr Fadel. Les patients présentant des mutations sur le gène *BMPRII* ont été exclus de nos études. Le groupe contrôle était constitué de poumons de patients obtenus lors de lobectomie ou pneumonectomie pour cancer pulmonaire localisé. Les échantillons utilisés ont été collectés à distance du foyer tumoral et considérés comme ne présentant pas de caractéristiques cancéreuses par les anatomopathologistes du Centre Chirurgical Marie Lannelongue. Les études ont été approuvées par un comité d'éthique indépendant (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France) et le consentement libre, éclairé et écrit de tous les patients a été recueilli avant la mise en place des études.

2 Isolement des CML-AP, culture et traitements cellulaires

Les CML-AP ont été isolées selon la technique d'explants mise au point par le laboratoire (Eddahibi *et al.*, 2001). Les artères pulmonaires (5 à 10 mm de diamètre), placées dans du milieu de transport DMEM lors du prélèvement chirurgical et stockées maximum 48h à 4°C, ont été ouvertes, rincées, débarrassées de la couche endothéliale et du tissu conjonctif. La média résiduelle des AP a été découpées en petits morceaux nommés explants (3 à 5 mm²), qui ont été placés dans des plaques 6 puits en présence d'un milieu complet composé de: DMEM 4,5g glucose/l, SVF 15%, L-glutamine 2 mM, HEPES 20 mM, EGF 10 U/ml, ITS 1X, des antibiotiques (penicilline 100 U/ml et streptomycine 0.1 mg/ml) et un fongicide (fungizone 0,05 mg/ml). Après environ deux semaines d'incubation en plaques 6 puits, les CML-AP ont été collectées par trypsination et placées dans de nouvelles boites de culture de plus grande surface (constituant ainsi le premier passage). Les CML-AP ont été utilisées

pour les expérimentations entre les passages 3 et 6. Les traitements suivants ont été testés sur les CML-AP en culture par incubation dans du milieu pendant 24 heures: étoposide (dilué dans du DMSO, 200 μ M final, Sigma-Aldrich), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 dilué dans de l'eau stérile, 250 μ M final, Sigma-Aldrich), Nutlin-3a (N3 dilué dans du DMSO, 20 μ M final, Sigma-Aldrich), pifithrin- α (PFT dilué dans du DMSO, dose croissante de 0,1 à 50 μ M final, Interchim, en présence ou absence de 200 μ M étoposide ou de 150 μ M H_2O_2) et cisplatine (dilué dans du NaCl 0.9%, 25 μ M final, Sigma-Aldrich).

Modèles expérimentaux *in vivo* d'HTAP sur rats

1 Modèles d'études

Les études *in vivo* ont été menées sur des rats adultes mâles Wistar pesant 200 à 250 g (Charles River) selon les recommandations institutionnelles en vigueur, avec un accord au préalable pour les études réalisées au sein de l'animalerie du Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France). Les rats avaient accès ad libitum à de l'eau et à de la nourriture. Des groupes d'au moins cinq animaux par condition ont été constitués.

1.1 Modèle monocrotaline

Nous avons étudié l'implication de p53 au cours du développement de l'HTAP expérimentalement induite par mono-injection sous-cutanée de monocrotaline (MCT, 60 mg/kg, Sigma-Aldrich). Les rats du groupe contrôle ont reçu une injection sous-cutanée de solvant (HCl 1N, NaOH 1N et PBS). Une cinétique de prélèvements d'organes (poumons et cœur) a été effectuée à J1, J3, J7, J14 et J21 post-injection de MCT.

1.2 Etude *in vivo* de l'inactivation pharmacologique de p53

Afin d'inactiver la voie de p53, le pifithrin- α (PFT, 2.2 mg/kg/j, Interchim) a été administré quotidiennement à des rats par injection intra-péritonéale pendant 14 jours. Les rats constituant le groupe « contrôle négatif » ont reçu une injection quotidienne de solvant (DMSO1% NaCl). Nous avons également constitué un groupe « contrôle positif » qui a reçu une mono-injection de MCT à J0,

ainsi qu'un groupe doublement traité « MCT+PFT » qui a reçu une mono-injection de MCT à J0 associée à des injections quotidiennes de PFT.

2 Evaluation du développement d'une HTAP chez les rats

2.1 Paramètres hémodynamiques

Les rats ont été anesthésiés avec de la kétamine (60 mg/kg i.p., MTC Pharmaceuticals) et de la xylazine (4 mg/kg i.p., Bayer). Un fin cathéter en polyvinyl a été introduit dans la veine jugulaire puis poussé jusqu'à l'artère pulmonaire via le ventricule droit. La PAP a été mesurée grâce au logiciel LabChart (ADInstruments, USA).

Le thorax a ensuite été rapidement ouvert afin de prélever les poumons et le cœur. Les poumons gauches ont été immédiatement congelés afin d'évaluer l'expression des protéines de la voie p53 (cf. Matériels et Méthodes « Etude de l'expression protéique »). Les poumons droits ont été fixés dans leur état distendu grâce une infusion intra-trachéale de solution de formol.

2.2 Hypertrophie cardiaque droite

Le cœur a été disséqué et pesé dans le but de calculer l'index d'hypertrophie cardiaque droite, appelé index de Fulton, évaluant le ratio du poids du ventricule droit divisé par le poids du ventricule gauche plus septum (VD/VG+S). Dans les modèles d'HTAP, le poids de VG+S est constant et non augmenté par rapport aux contrôles.

2.3 Muscularisation des artères pulmonaires

Après inclusion en blocs de paraffine des poumons fixés au formol, des sections pulmonaires de 5µm d'épaisseur ont été montées sur des lames Superfrost. Une coloration hématoxyline-éosine a permis d'évaluer l'état de muscularisation (selon l'épaisseur de la media) de 40 à 60 artères pulmonaires intra-acinaires pour chaque rat. Les AP ont alors été catégorisées en trois groupes: complètement muscularisées (M), partiellement muscularisées (PM) et non muscularisées (NM).

2.4 Coloration et marquages immuno-histochimiques sur coupes pulmonaires de rats

La prolifération cellulaire et l'infiltration de macrophages au sein des AP ont été évaluées respectivement grâce à un marquage PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et un marquage CD68. Les coupes pulmonaires ont été déparaffinées dans du toluène puis passées dans une série de bains à pourcentage d'éthanol décroissant et réhydratées dans du PBS (ou TBS). Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de démasquage des sites antigéniques (citrate pH6, K0035, Diagnostic Biosystem) et placées dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min. Après un rinçage dans du PBS (ou TBS), les coupes ont été incubées dans une solution de saturation (10% sérum de l'hôte de l'anticorps secondaire +/- 5% BSA dilué dans du PBS) pendant 30 minutes afin de bloquer les sites aspécifiques. Les coupes ont ensuite été directement mises en contact avec l'anticorps primaire: anticorps monoclonal de souris anti-PCNA (1/200^{ème}, PC-10, Dako) ou anticorps monoclonal de souris anti-CD68 (1/200^{ème}, MCA341R, AbDserotec), pendant une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'anticorps primaire a ensuite été rincé plusieurs fois puis deux types de révélation ont été utilisés:

- pour le marquage PCNA: les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris biotinylé (30 minutes à température ambiante) suivi d'une phase d'amplification reconnaissant les biotines avec le kit Vectastain ABC-AP (AK-5002, Vector Laboratories). La révélation a ensuite été obtenue à l'aide du kit Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate (SK-5100, Vector Laboratories). Enfin, une contre-coloration à l'hématoxyline a été réalisée afin de visualiser les noyaux.
- pour le marquage CD68: les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorophore Alexa-fluor 594 (30 minutes à température ambiante) (Invitrogen). Afin de visualiser les CML-AP, les coupes ont été incubées avec un anticorps anti- α actine couplé à un fluorophore FITC (une heure à température ambiante) (1/200^{ème}, clone 1A4, F3777, Sigma-Aldrich). Enfin, les noyaux ont été marqués au DAPI (0.25 mg/ml dilué dans du PBS).

Par ailleurs, une coloration au trichrome de Masson a été réalisée sur les coupes pulmonaires de rats afin d'évaluer l'accumulation de matrice extracellulaire comprenant une coloration du collagène au bleu d'aniline, une coloration des noyaux à l'hématoxyline et une coloration du cytoplasme cellulaire à la fuschine ponceau.

Ces marquages ont été analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i, Japon).

Etude de la séquence du gène *TP53*

L'ADN génomique total a été extrait à partir de culots de CML-AP de dix patients HTAPi à l'aide du QiAmp DNA mini kit® (Qiagen) selon la procédure recommandée par le fournisseur. Les séquences exoniques (exons 2 à 11) du gène humain *TP53* ont été amplifiées par PCR à partir de 50 ng d'ADN génomique total, avec des paires d'amorces spécifiques de ces séquences (0,4 µM final) (Tableau 5), en présence de la GoTaq Hot Start Polymerase® (0,5 U final), d'un mix de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,2 mM final), d'un milieu réactionnel pour PCR Colorless® sans MgCl₂ (1X final) supplémenté en MgCl₂ (1.5 mM final) et complété avec de l'eau purifiée dédiée à la PCR, selon les instructions recommandées par le fournisseur (kit M5001, Promega) et à l'aide du système de PCR en temps réel StepOnePlus® (Applied Biosystems). L'intégrité des amplicons a été vérifiée visuellement après migration sur gels d'agarose contenant du bromure d'ethidium. Le séquençage des produits de PCR a été réalisé selon la méthode de Sanger par la société Beckman Coulter Genomics (appareil de séquençage à haut débit ABI 3730XL). Les séquences obtenues pour chaque exon et pour chaque patient ont été comparées à la séquence génomique de référence de *TP53* (NC_000017.10 de GenBank).

exon	amorce	séquence
exons 2-3	sens	TCTCATGCTGGATCCCACT
	anti-sens	AGTCAGAGGACCAGGTCCTC
exon 4	sens	TGAGGACCTGGTCCTCTGAC
	anti-sens	AGAGGAATCCCAAAGTTCCA
exons 5-6	sens	TGTTCACTTGTGCCCTGACT
	anti-sens	TTAACCCTCCTCCCAGAGA
exon 7	sens	CTTGCCACAGGTCTCCCCAA
	anti-sens	AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA
exon 8	sens	TTCCTTACTGCCTCTTGCTT
	anti-sens	AGGCATAACTGCACCCTTGG
exon 9	sens	GACAAGAAGCGGTGGAG
	anti-sens	CGGCATTTTGAGTGTTAGAC
exon 10	sens	CAATTGTA ACTTGA ACCATC
	anti-sens	GGATGAGAATGGAATCCTAT
exon 11	sens	AGACCCTCTCACTCATGTGA
	anti-sens	TGACGCACACCTATTGCAAG

Tableau 5: Séquences des amorces pour les PCR d'amplification des exons du gène *TP53*.

Les paires d'amorces utilisées sont celles recommandés par l'agence internationale pour la recherche sur le cancer (<http://p53.iarc.fr/>).

Etude de l'expression génique

Les ARNm totaux ont été extraits à partir de culots de CML-AP (récupérés par trypsination) de patients HTAPi et contrôles à l'aide du NucleoSpin® RNA II Kit (Machery-Nagel) puis ont subi une rétro-transcription en ADNc à l'aide du Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) selon les procédures recommandées par les fournisseurs. Les réactions de qPCR ont été effectuées à l'aide du système de PCR en temps réel LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) à partir de 12,5 ng d'ADNc, en présence de couples d'amorces spécifiques de chaque gène d'intérêt (élaborées à l'aide du logiciel LightCycler® Probe Design software 2.0 et présentées dans le Tableau 6), d'un mix de réaction LightCycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics) et d'eau purifiée dédiée à la PCR. L'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée selon le méthode $2^{-(\Delta C_t)}$ où le C_t correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal sort du bruit de fond (déterminé pour les gènes d'intérêt et pour le contrôle interne: 18S rRNA) et où le ΔC_t correspond à la différence entre le C_t du gène d'intérêt et le C_t du 18S. Chaque échantillon a été amplifié en duplicata.

	amorces	séquence
p53	sens anti-sens	AGAAACCACTGGATGGAGAATA GCGGGAGGTAGACTGAC
MDM2	sens anti-sens	CAAGACAAAGAAGAGAGTGTGG ATACTGGGCAGGGCTTATT
MDM4	sens anti-sens	GCTCACAGTTCTGAAAGCCAA ATGAATAATGTTCCCGTCTCGT
p21	sens anti-sens	ACTGGAGGGTACTTCG GCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
TP53INP1	sens anti-sens	CATCTCTTGAGTGCTTGGC GGACTTGTTCACCTTGATAG
AURKA	sens anti-sens	TGGGCTTTGGAAGACTTTGAA TTAGGATGCCGAAGGTGGGA
BAX	sens anti-sens	CGTGGACACAGACTCCC GCCTTGAGCACCAGTTTG
PUMA	sens anti-sens	CAAGAGGAGCAGCAGCG CTGGGTAAGGGCAGGAG
NOXA	sens anti-sens	GCCTACTGTGAAGGGAGATGA ACAATGTGCTGAGTTGGC
CYR61	sens anti-sens	TTACGCTGGATGTTTGAGTGT AACGCTGCTTCATTGGC
NRP1	sens anti-sens	CCCGCACCTCATTCTAC TATCATAGTTGTTGTTGCCCTCAA
PGF	sens anti-sens	GACGGCCAATGTCACCA GGCTTCATCTTCTCCCGC
PDGFA	sens anti-sens	GTCCGCCAACTTCCTGAT GCACTCCAAATGCTCCTCT
NOTCH1	sens anti-sens	ACTGCCAGACCAACATCA GCTCTCATAGTCCTCGGATT
CRIP2	sens anti-sens	GCCCTGCTATGGAATCCTC GCTGGACCTTGCCTTCG
ZC3H12A	sens anti-sens	CTACGAGTCTGACGGGAT GCTCCAAAGTGAGTGGC
PTK2	sens anti-sens	AAGTCTTCAGGGTCCGAT GTCCAGGTTGGCAGTAGG
ARHGAP24	sens anti-sens	ACTGGAGGATACTGTTCGT CTTCATACTTCGCATAAGGAATACT
HIF3A	sens anti-sens	ATCGGCTGTTCCGCCTA TCTCTTCCACCTGGCTGATTA
VEGFA	sens anti-sens	GTGCCCACTGAGGAGTC ACATTTGTTGTGCTGTAGGAAG

Tableau 6: Séquences des amorces utilisées pour les RT-qPCR.

Etude de l'expression protéique

1 Western-blots

Des western-blots ont été réalisés à partir des poumons gauches de rats et des culots de CML-AP. Les échantillons ont été lysés à froid (4°C pendant 30 minutes) dans un tampon de lyse composé de: Igepal (CA-630) 1%, Glycérol 10%, Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 137 mM, EDTA 2 mM, Na₃VO₄ 1 mM, aprotinine 10 µg/ml, leupeptine 10 µg/ml, pepstatine 10 µg/ml, complété d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (1 pastille pour 5 ml final, Roche). Les protéines ont été dosées par la technique BCAssay (Interchim) qui permet d'obtenir des valeurs d'absorbance directement proportionnelles à la concentration protéique de chaque échantillon déterminée grâce à une courbe de référence avec la BSA. Après une phase de dénaturation (dans du LDS et du DTT), les protéines totales (20-40 µg pour les CML-AP, 100 µg pour les poumons de rats) ont été séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide 4-12% NuPage® Bis-Tris gels (Invitrogen) puis transférées sur des membranes PVDF ou nitrocellulose (GE Healthcare). Les membranes PVDF ont été incubées dans du lait écrémé 5% alors que les membranes nitrocellulose ont été incubées dans un tampon de blocage spécifique (Thermo Fischer Scientific) pendant au moins une heure à température ambiante afin de bloquer les sites aspécifiques. Les membranes PVDF ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants: monoclonal de souris anti-p53 (pour la détection de p53 dans les CML-AP, 1/500^{ème}, clone DO-1, sc-126, Santa Cruz), monoclonal de souris anti-p53 (pour la détection de p53 dans les poumons de rats, 1/250^{ème}, clone PAb122, LS-C63152, LSBio), polyclonal de lapin anti-p53 phosphorylé sérine 15 (1/1000^{ème}, 9284, Cell Signaling), polyclonal de lapin anti-Bax (1/100^{ème}, sc-493, Santa Cruz), polyclonal de lapin anti-p21 (1/200^{ème}, sc-397, Santa Cruz), monoclonal de souris anti-MDM2 (1/250^{ème}, MCA1709, AbDserotec) ou monoclonal de souris anti-βactine (1/5000^{ème}, clone AC-74, A5316, Sigma-Aldrich). Les membranes nitrocellulose ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants: monoclonal de souris anti-TAp73 (1/500^{ème}, clone 5B429, IMG-246, Imgenex), monoclonal de souris anti-dNp73 (1/250^{ème}, clone 38C674.2, IMG-313A, Imgenex), monoclonal de souris anti-βactine (1/5000^{ème}, clone AC-74, A5316, Sigma-Aldrich) ou monoclonal de souris anti-GAPDH (1/5000^{ème}, ab8245, Abcam). Par la suite, les membranes PVDF

ont été incubées pendant une heure à température ambiante avec des anticorps secondaires HRP (1/10000^{ème} anti-souris ou 1/5000^{ème} anti-lapin, Santa Cruz) et les membranes nitrocellulose avec des anticorps secondaires anti-souris couplés à des fluorophores infra-rouge (1/15000^{ème}, LI-COR, Biosystems). Le signal HRP a été détecté par la méthode chimioluminescente ECL (Immun-Star WesternC kit, Biorad) à l'aide d'un ChemiDoc XRS+ (Biorad) et quantifié par le logiciel ImageLab, alors le signal infra-rouge a permis une révélation plus sensible par le système Odyssey (LI-COR, Biosystems) adaptée pour des protéines plus faiblement exprimées. Les résultats obtenus pour les protéines d'intérêt ont été normalisés par la quantification obtenue pour l'actine (ou la GAPDH si une bande non spécifique apparaissait au niveau du poids moléculaire de l'actine 43 kDa).

2 Marquages immuno-fluorescents sur CML-AP

Afin d'évaluer la localisation intra-cellulaire de p53, des marquages immuno-fluorescents ont été réalisés sur les CML-AP fixées au préalable avec du paraformaldéhyde 4% sur des lamelles. Les cellules ont été mises en contact avec un anticorps polyclonal de lapin anti-p53 (1/200^{ème}, sc-6243, Santa Cruz) et un anticorps monoclonal de souris anti-ATP50 (1/1000^{ème}, ab110276, Abcam), une protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale, dans un tampon composé de PBS, BSA 1%, Tween 0.5%, pendant deux heures à température ambiante ou une nuit à 4°C. Des contrôles négatifs des marquages (avec des IgG contrôles à la place des anticorps primaires d'intérêt) ont été effectués afin de valider la spécificité du marquage obtenu. Des anticorps secondaires couplés à des fluorophores de type Alexa Fluor 594 (pour p53) et 488 (pour ATP50) (Molecular Probes, Invitrogen) ont ensuite été incubés sur les cellules pendant une heure à température ambiante. Pour finir, une contre-coloration des noyaux au DAPI a été effectuée. Une fixation du marquage a été réalisée avec un milieu de montage spécifique au marquage fluorescent (Dako). Les marquages fluorescents ainsi obtenus ont été analysés à l'aide d'un microscope confocal LSM 700 associé au logiciel d'analyse d'images Zen (Carl Zeiss). Au moins cinq photos par cellule ont été prises aux grossissements x400 et x630 en gardant les mêmes réglages de prise de vue d'une cellule à l'autre.

3 Marquages immuno-histochimiques (IHC) sur tissus pulmonaires humains

Un marquage IHC p53 sur des sections paraffinées de poumons de patients HTAPi et contrôles a été réalisé par un laboratoire d'anatomopathologie clinique (CHU Saint-Eloi, Montpellier) selon un protocole utilisé classiquement en routine dans ce laboratoire avec l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-p53 (clone 1801, NCL-p53-1801, Leica Biosystems) et détecté par les substrats DAB (3, 3'-diaminobenzidine). Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés à l'aide de l'hématoxyline.

Un marquage IHC TAp73 a également été réalisé sur des sections paraffinées de poumons de patients HTAPi et contrôles. Les coupes ont été déparaffinées dans du toluène puis passées dans une série de bains à pourcentage d'éthanol décroissant et réhydratées dans de l'eau distillée. Les coupes ont été incubées dans une solution de démasquage des sites antigéniques (citrate pH6, K0035, Diagnostic Biosystem) et placées dans une cocotte-minute adaptée au procédé de démasquage. Afin de bloquer les sites aspécifiques, les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de saturation (10% de sérum de cheval, hôte du secondaire (AK-5002, Vector Laboratories)) pendant 30 minutes puis directement mises en contact avec l'anticorps primaire monoclonal de souris anti-TAp73 (1/100^{ème}, clone 5B429, IMG-246, Imgenex) en présence d'une solution de blocage des streptavidines/biotines endogènes (SP-2002, Vector Laboratories) pendant toute la nuit à 4°C. Un contrôle négatif du marquage (avec des IgG contrôles de souris à la place de l'anticorps primaire d'intérêt) a été effectué. Par la suite, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris biotinylé (BA-9200, Vector Laboratories) 30 minutes à température ambiante, révélé par la streptavidin-594 (1/200^{ème}, SA-5594, Vector Laboratories) 30 minutes à température ambiante. Les fibres de muscle lisse ont été révélées par une incubation avec un anticorps anti- α actine couplé à un fluorophore FITC une heure à température ambiante (1/200^{ème}, clone 1A4, F3777, Sigma-Aldrich). Pour finir, une contre-coloration des noyaux au DAPI a été réalisée. Ces marquages ont été analysés à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i, Japon).

Etudes des fonctions cellulaires

1 Prolifération/viabilité

Des tests MTT (sel de tétrazolium) ont été effectués afin d'évaluer la prolifération/viabilité cellulaire des CML-AP traitées par l'étoposide, l' H_2O_2 , la Nutlin-3a et le PFT. Pour ce faire, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 10^5 cellules par puit (24 heures dans du milieu complet) puis privées de sérum (48 heures) afin d'induire un arrêt du cycle cellulaire. Les cellules ont ensuite été traitées par les différents agents dans du milieu complet pendant 24 heures. Le MTT a alors été ajouté au milieu pendant quatre heures permettant au tétrazolium de réduire la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en formazan, formant un précipité violacé dont la quantité est proportionnelle à la quantité de cellules métaboliquement vivantes et qui a été quantifié par spectrophotométrie à 570 nm (microplate reader model 680, Biorad). Toutes les conditions ont été évaluées en triplicata.

2 Apoptose

L'effet du PFT sur l'apoptose des CML-AP a été évalué en absence ou en présence d' H_2O_2 par des tests TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) qui mesurent la fragmentation de l'ADN induite par l'apoptose sur des cellules préalablement fixées au paraformaldéhyde 4% sur des lamelles. Les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100, puis ont été incubées dans une atmosphère humide pendant une heure à 37°C avec un mélange réactionnel TUNEL permettant à l'enzyme recombinante TDT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) d'incorporer des dUTP couplés à la fluorescéine à l'extrémité 3'-OH des brins d'ADN, en suivant les recommandations du fournisseur du DeadEnd TUNEL System (Promega). Les noyaux ont été contre-colorés au DAPI puis les cellules ainsi marquées ont été analysées à l'aide d'un microscope à épifluorescence et du logiciel NiS element (Nikon 80i, Japon). La quantification des cellules positives au marquage TUNEL (dont le noyau apparaissait en rouge) a été effectuée à partir de quatre images par lamelles.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism et les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Avant tout, la distribution gaussienne des données a été évaluée par des tests de normalité Kolmogorov-Smirnov. Les données qui suivaient une distribution gaussienne ont été analysées par des tests paramétriques: des analyses de variance ANOVA associées à des post-tests Dunnett pour comparer au moins trois groupes à un groupe contrôle et des t-tests pour comparer deux groupes. Des post-tests Tukey ont été effectués pour comparer les trois groupes traités entre eux dans l'étude *in vivo* PFT. Les valeurs appariées ont été analysées par des ANOVA pairées ou des t-tests pairés. Les données qui ne suivaient pas une distribution gaussienne ont été analysées par des tests non paramétriques: des tests Kruskal-Wallis (pour comparer au moins trois groupes) et des tests Mann-Whitney (pour comparer deux groupes) quand les valeurs étaient non appariées; des tests Friedman (pour comparer au moins trois groupes) et des tests Wilcoxon (pour comparer deux groupes) quand les valeurs étaient appariées.

Résultats

Partie 1: Rôle de p53 au cours du développement de l'HTAP expérimentale et conséquences physiopathologiques de l'inactivation pharmacologique de p53 dans un modèle *in vivo*

Au vu du phénotype pseudo-tumoral décrit dans l'HTAP, nous nous sommes intéressés à la possible altération de la voie de p53 dans le développement de l'HTAP. Les premières données observées dans l'HTAP et qui ont contribué à susciter notre intérêt pour cette voie ont été obtenues grâce à des modèles expérimentaux *in vivo* d'induction d'HTAP. En 2011, Mizuno et al. ont montré que les souris génétiquement déficientes en p53 développaient une HTAP plus sévère en réponse à une hypoxie chronique que les souris sauvages (Mizuno *et al.*, 2011) et en 2013, Mouraret et al. ont mis en évidence l'effet protecteur d'un activateur pharmacologique de p53, la Nutlin-3a, dans plusieurs modèles murins d'HTAP (Mouraret *et al.*, 2013). Cependant dans ces deux études l'expression de p53 n'était pas différente des contrôles voire augmentée dans les poumons des souris HTAP; alors qu'une autre étude montre une diminution du taux protéique de p53 dans les poumons de rats HTAP (Ravi *et al.*, 2013). Le rôle de p53 dans le développement de l'HTAP restait donc à éclaircir.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons évalué la voie de p53 au cours du développement de l'HTAP dans un modèle expérimental d'induction d'HTAP par injection de MCT chez le rat grâce à une cinétique temporelle de prélèvements des poumons (de J1 à J21 post-injection de MCT). L'analyse des western-blots a mis en évidence une diminution de l'expression protéique de p53 dès le premier jour post-injection (J1), qui se maintient pendant la première semaine (J3 et J7) par comparaison au groupe contrôle. S'en suit une normalisation de l'expression protéique de p53 à partir du 14^{ème} jour, période correspondant à l'apparition des premiers signes d'HTAP chez les rats MCT. De manière similaire, nous observons une diminution du taux protéique de sa cible transcriptionnelle p21

lors de la première semaine, suggérant une dérégulation (emballement) du cycle cellulaire aux stades initiateurs du développement de l'HTAP dans le modèle MCT. En revanche nos résultats semblent indiquer que l'expression protéique de BAX, une autre cible transcriptionnelle de p53 impliquée dans l'apoptose (qui peut en outre être régulée par d'autres voies), ne soit pas altérée dans ce modèle. Concernant le principal régulateur de p53 qu'est MDM2 (qui est également une des cibles transcriptionnelles de p53), un profil d'expression protéique comparable à celui de p53 est obtenu avec une réduction lors de la première semaine par rapport au groupe contrôle.

Dans un second temps, nous avons étudié les conséquences physiopathologiques de l'inactivation pharmacologique de p53 avec le pifithrin- α (PFT), un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de p53. Ce traitement a été administré quotidiennement à des rats pendant 14 jours, seul ou en combinaison avec la MCT (injection à J0), et a été comparé à un groupe contrôle n'ayant reçu que le solvant (contrôle négatif de pathologie) et à un groupe traité avec la MCT seule (contrôle positif de pathologie). Les mesures des paramètres hémodynamiques aux termes des 14 jours de traitement révèlent une augmentation significative des PAPm dans les trois groupes traités: le contrôle positif de pathologie (MCT), le groupe PFT « seul » et le groupe doublement traité « MCT+PFT ». L'induction d'une HTAP est confirmée par le développement d'un remodelage vasculaire au niveau des petites artères pulmonaires, caractérisé par une musculation, une augmentation du nombre de cellules proliférantes et une accumulation de fibres de collagène. Cette HTAP est associée à une hypertrophie cardiaque droite au vu de l'élévation de l'index de Fulton. De plus, la combinaison MCT+PFT aggrave certains paramètres de l'HTAP (musculation des artères pulmonaires et hypertrophie cardiaque) par rapport aux groupes MCT ou PFT « seul ». Au niveau cellulaire, le PFT a des effets pro-prolifératif et anti-apoptotique, caractérisés dans notre étude sur des CML-AP de patients contrôles. Ces cellules développent ainsi un phénotype similaire à celui des CML-AP HTAP, illustrant l'impact physiopathologique de l'inactivation de p53 dans l'acquisition des caractéristiques pseudo-tumorales des CML-AP au cours de l'HTAP.

En conclusion ces résultats mettent en évidence l'implication de l'inactivation de la voie de p53 lors de la phase initiatrice du développement de l'HTAP expérimentale.

Article soumis à publication dans un journal international:

**Inactivation of p53 is sufficient to induce development of
pulmonary hypertension in rats**

S. Jacquin^{1,3}, V. Rincheval², B. Mignotte², S. Richard³, M. Humbert¹, O. Mercier⁵, A. Londoño-Vallejo⁴, E. Fadel⁵, S. Eddahibi³

¹INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France

²Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France

³INSERM U1046, Centre Hospitalier Universitaire Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France

⁴Telomeres & Cancer laboratory, labeled “Ligue contre le Cancer”, UMR3244, Institut Curie, Paris, France

⁵Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

Correspondence : Saadia Eddahibi: INSERM U1046, Centre Hospitalier Universitaire Arnaud de Villeneuve, 371 avenue du doyen Gaston Giraud 34295 Montpellier cedex 05, France ;
E-mail : saadia.eddahibi@inserm.fr

Keywords: pulmonary hypertension, pulmonary artery smooth muscle cells, p53, pifithrin- α , proliferation

Total number of figures: 4

Word count: 3520 (excluding Materials and Methods, including figures legends)

Abstract

Objective: Pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) in pulmonary arterial hypertension (PAH) show similarities to cancer cells. Due to the growth-suppressive and pro-apoptotic effects of p53, and its inactivation in cancer, we hypothesized that the p53 pathway could be altered in PAH. We therefore explored the involvement of p53 in the monocrotaline (MCT) rat model of pulmonary hypertension (PH) and the pathophysiological consequence of p53 inactivation in response to animal treatment with pifithrin- α (PFT, an inhibitor of p53 activity).

Approach and Results: PH development was assessed by pulmonary arterial pressure, right ventricular hypertrophy and arterial wall thickness and the effect of MCT and PFT on lung p53 pathway expression was evaluated by western blots. Fourteen days of daily PFT treatment (2.2 mg/kg/day), similarly to a single injection of MCT (60 mg/kg), induced PH and aggravated MCT-induced PH. In the first week after MCT administration and prior to PH development, p53, MDM2 and p21 protein levels were significantly reduced; whereas PFT administration altered effectively p53 targets protein level. The direct effect of PFT on pulmonary cells apoptosis and proliferation was assessed on cultured human PA-SMCs by TUNEL and MTT assays and revealed a decrease of apoptosis and an increase of PA-SMCs growth associated with 50 μ M PFT.

Conclusions: Pharmacological inactivation of p53 is sufficient to induce PH with a chronic rat treatment by PFT, an effect related to anti-apoptotic and pro-proliferative properties. P53 pathway was down-expressed in the first week in the rat MCT model. These *in vivo* experiments indicate that p53 pathway plays a key role in the initiation of PH pathogenesis.

Non standard abbreviations and acronyms

PAH: pulmonary arterial hypertension

PA-SMCs: pulmonary artery smooth muscle cells

PA-ECs: pulmonary artery endothelial cells

PAP: pulmonary arterial pressure

PH: pulmonary hypertension

PA: Pulmonary Artery

MCT: monocrotaline

PFT: pifithrin- α

s.c: subcutaneous

i.p: intraperitoneal

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

RV: right ventricular

LV: left ventricular

S: septum

H₂O₂: hydrogen peroxide

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease in which pressure elevation in the pulmonary arteries (PA) leads to right heart failure and death. There is no cure for PAH, and the effects of available therapeutic options are restricted to partial symptoms improvement with a limited increase in survival. PAH develops as an idiopathic disease (iPAH), or more in association with underlying diseases, with an estimated incidence of 1 to 2 per million per year (Simonneau *et al.*, 2009). Artery wall remodeling is the hallmark of severe advanced PAH. The central cellular processes underlying this vascular remodeling include an increase of pulmonary artery smooth muscle cell (PA-SMCs) growth and resistance to apoptosis (Archer *et al.*, 2010b; Rabinovitch, 2012). Although the fundamental cause remains elusive, many disease-predisposing and function-modifying characteristics of PA-SMCs have been identified, including inflammation, cross-talk with pulmonary artery endothelial cells (PA-ECs), and *BMPRII* gene mutations (Eddahibi *et al.*, 2006; Humbert *et al.*, 2004b). In another hand, several studies indicate that PA-SMCs from iPAH patients express abnormal phenotypes *ex vivo*, when separated from the influence of endothelial and inflammatory cells, suggesting intrinsic alterations in PA-SMCs characteristics resulting in dysfunctions in the signaling pathways that control cell cycle progression and proliferation.

Cellular phenotypic similarities between PAH and cancer have been proposed (Adnot *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2008; Sakao *et al.*, 2011; Voelkel *et al.*, 1998). Indeed, pulmonary vascular remodeling observed in PAH is associated with hyper-proliferation, hypertrophy and distal extension of PA-SMCs, resistance to apoptosis, mitochondrial dysfunction with a “Warburg metabolic phenotype”, genomic instability and expression of cancer biomarkers (Archer *et al.*, 2008; Humbert *et al.*, 2004b; McMurtry *et al.*, 2005).

Owing to the tumor suppressor properties of p53 (Levine, 1997; Vogelstein *et al.*, 2000), this protein has recently sparked interest in the PAH community. Mizuno *et al.* demonstrated that p53 knockout mice developed a more severe PH in response to chronic hypoxia compared to wild-type mice (Mizuno *et al.*, 2011). More recently, Mouraret *et al.* observed that Nutlin-3a, a MDM2 inhibitor (Vassilev *et al.*, 2004), protected mice in different models of experimental pulmonary hypertension (PH) (Mouraret *et al.*, 2013). However, the consequence of pharmacological direct inactivation of p53 on development of PH has not been investigated. For that we chose the model of monocrotaline-induced PH in rats, which results primarily from marked alterations in PA structure, including medial hypertrophy and intimal fibromuscular hyperplasia, similar to those observed in some forms of human PH.

In this work we questioned if inhibition of p53 activity by pifithrin- α (PFT) could induce pulmonary vascular remodeling and/or aggravate the MCT-induced PH model in rats. We evaluated lung p53 pathway protein expression during the development of MCT-induced PH and in response to PFT. The effect of PFT on the growth/apoptosis balance in isolated human PA-SMCs was also investigated.

Materials and Methods

Animal models and experimental design

All experiments were performed in adult male Wistar rats (200 to 250 g) according to institutional guidelines that comply with national and international regulations.

In the first part of the study, PH development and pulmonary expression of p53 were examined in rats at various times after a single subcutaneous (s.c.) injection of MCT (60 mg/kg in HCl 1N, NaOH 1N and PBS, Sigma-Aldrich). Then, to assess the pathophysiological consequence of pharmacological p53 activity inhibition, we assigned rats at random to 1 of 4 groups (5 animals in each group): two groups received daily intraperitoneal (i.p.) injection of PFT (2.2 mg/kg/day in DMSO 1% NaCl, Interchim); two groups received vehicle. Treatments were given for two weeks after a single MCT injection or after an injection of vehicle.

Assessment of PH

Rats were anesthetized with ketamine (60 mg/kg i.p., MTC Pharmaceuticals) and xylazine (4 mg/kg i.p., Bayer). A polyvinyl catheter was introduced into the right jugular vein and pushed through the right ventricle into the PA. After measurement of pulmonary arterial pressure (PAP) with LabChart software (ADInstruments, USA), the thorax was opened and the left lung immediately removed and frozen for measurement of p53 expression. The heart was dissected and weighed for calculation of the right ventricular hypertrophy index (ratio of right ventricular free wall weight divided by the sum of the septum plus left ventricular free wall weight (RV/LV+S)). The right lung was fixed in the distended state with intratracheal infusion of formalin buffer. After paraffin embedding, 5- μ m-thick lung sections were mounted on Superfrost slides and stained with hematoxylin-eosin. In each rat, 40 to 60 intra-

acinar arteries were analyzed and categorized as fully muscularized (M), partially muscularized (PM) or non-muscularized (NM) to assess the degree of muscularization.

Evaluation of in situ PA-SMCs proliferation, matrix accumulation and macrophages infiltration

To assess PA-SMCs proliferation on rat pulmonary arteries, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining was performed. Tissue sections were deparaffinized in toluene and then treated with a graded series of ethanol washes, rehydrated in TBS (pH 7.5), and incubated with target retrieval solution (citrate pH6, K0035, Diagnostic Biosystem) in a pressure cooker. Slides were then washed in TBS, incubated for 30 minutes in a protein-blocking solution, and incubated for 1 hour with anti-PCNA mouse monoclonal antibody (PC-10, 1:200, Dako) in presence of streptavidin/biotin endogenous blocking reagents (SP-2002, Vector). Then the slides were incubated with mouse biotinylated secondary antibody for 30 minutes, followed by an amplification step with the Vectastain ABC-AP Kit (AK-5002, Vector) for 30 minutes. The revelation was processed with the Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit (SK-5100, Vector), and nuclei were counterstained with hematoxylin.

To analyze matrix accumulation, a Masson trichrome stain using hematoxylin (nuclear staining), ponceau fuchsin (cytoplasm staining) and anyline blue (collagen staining) was performed on lungs sections.

The infiltration of macrophages was evaluated by immunostaining using a mouse monoclonal anti-CD68 antibody (MCA341R, AbDserotec) revealed by 594-Alexa fluor anti-mouse secondary antibody. Smooth muscle fibers were stained with a mouse monoclonal anti- α SMA FITC conjugated antibody (F3777, Sigma-Aldrich). Nuclei were stained with DAPI.

At the end of the procedure, all stainings were analyzed with an epifluorescence microscope and NiS element software (Nikon 80i, Japan).

Western blot

Western blot assays were performed on rat lungs stored at -80°C. Samples were lysed in buffer containing phosphatases and proteases inhibitors (Sigma-Aldrich and Roche). Total proteins (100 µg) were separated on 4-12% NuPage Bis-Tris gels (Invitrogen) and transferred on PVDF membranes (GE Healthcare). Then the membranes were incubated over-night at 4°C with primary antibody: mouse monoclonal anti-p53 (LS-C63152, LSBio.), rabbit polyclonal anti-p21 (sc-397, Santa Cruz), rabbit polyclonal anti-Bax (sc-493, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-MDM2 (MCA1709, AbDserotec) or mouse monoclonal anti-βactin (A5316, Sigma-Aldrich). Incubation with secondary HRP antibodies (anti-mouse sc-2314 or anti-rabbit sc-2313, Santa Cruz) was performed for 1 hour at room temperature. HRP signals were detected by ECL substrate (Immun-Star WesternC Kit, Biorad) using a ChemiDoc XRS+ (Biorad) and blots were quantified and normalized by β-actin signal with ImageLab software (Biorad).

In vitro study and cells treatment

The assays were performed on human PA-SMCs isolated from lungs obtained during lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer, collected by the anatomo-pathologist at a distance from the tumor loci and considered as control cells without tumoral characteristics. This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France) and all patients provided informed consent before the study. Human PA-SMCs were isolated and cultured as previously described (Eddahibi *et al.*, 2001). The assays were performed on cells at passages 3-6. PA-SMCs were treated for 24 hours with

increasing doses of PFT (0,1 μ M to 50 μ M, Interchim), in the presence or absence of 200 μ M etoposide, Sigma-Aldrich) or 150 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2 , Sigma-Aldrich).

PA-SMCs proliferation-viability assay

The effect of PFT on the PA-SMCs proliferation-viability of PA-SMC was assessed by MTT assays. Briefly, cells were seeded in 96-wells culture plates with 10^5 cells per well for 24 hours in medium supplemented with 10% FBS, followed by a FBS deprivation for 48 hours to induce growth arrest. Cells were then treated for 24 hours in medium supplemented with 10% FBS. MTT tetrazolium dye was added and after 4 hours incubation at 37°C, the colored formazan formation dissolved in DMSO was analyzed by a spectrophotometer at 570 nm (microplate reader Model 680, Biorad). All samples were analyzed in triplicate.

PA-SMCs apoptosis detection

Apoptosis of PA-SMCs was evaluated by immunostaining with TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) assays. Briefly, paraformaldehyde-fixed cells grown on coverslips were incubated with TUNEL reaction mixture in a humidified atmosphere for 1 hour at 37°C in the dark according to the manufacturer's instructions (DeadEnd TUNEL System, Promega). Cells on coverslips were then counterstained with DAPI and examined with an epifluorescence microscope and NiS element software (Nikon 80i, Japan). Quantification of TUNEL positives cells were performed with 4 images per coverslips.

Statistics

Statistics were performed on GraphPad Prism 5 software and data were expressed as means \pm SEM. Firstly, Gaussian distributions of values were tested with adequate normality tests (Kolmogorov-Smirnov test). Data that follow Gaussian distribution were analyzed with parametric tests, such as ANOVA associated with Dunnett post-tests to compare three or

more groups to control group and t-tests to compare two groups. Tukey post-tests were performed for statistical comparisons of the three treated groups in the study evaluating the effect of PFT- α on rat. Matched ANOVA or paired t-tests were used when values are paired. Data that do not follow Gaussian distribution were analyzed with non parametric tests (Mann-Whitney tests).

Results

Development of MCT-PH is associated to early p53 decrease

In order to determine the temporal expression of p53 in PH development, the lung protein level was measured at various times after MCT injection. The results showed an early and dramatically decrease of p53 protein level within the first 24 hours, which was maintained during the first week compared to controls (day 1, $p=0.0159$; day 3, $p=0.0079$ and day 7, $p=0.0079$). Then the p53 protein expression was gradually increased and normalized from the second week. This result revealed that deregulation of p53 is early and arises in the initiation stage of PH development in the MCT rat model. Similarly, the protein level of p21, a transcriptional target of p53 implicated in cell cycle arrest, was significantly decreased during the first week compared to controls (day 1, $p=0.0317$; day 3, $p=0.0159$ and day 7, $p=0.0159$). In contrast, no difference in BAX protein level was found in comparison to untreated animals. We also measured the protein level of MDM2, the major regulator of p53 and also a transcriptional target of p53. Similarly to p53, the MDM2 protein level was decreased during the first week compared to the value obtained in controls (day 1, $p=0.0095$; day 3, $p=0.0043$ and day 7, $p=0.0095$) (figure 1E).

PH induction by pharmacological p53 inactivation with PFT in rat

First, to validate the effect of PFT on p53 activity, western blots were performed on lungs samples collected at the end of the 14 days of the experiment. As shown in figures 2C and 2D, PFT rat treatment decreased both p21 and BAX protein levels compared to the control group ($p=0.0080$ and $p=0.0079$, respectively). These results supported the effective inhibition of p53 activity with PFT treatment. Moreover, as illustrated in figure 2B, the p53 protein level was decreased significantly in the MCT+PFT group compared to the control group ($p=0.0025$), suggesting a possible synergic effect of the two compounds.

To determine whether inhibition of p53 activity would influence PH development alone and/or affect the MCT-induced PH, PFT was injected daily for 14 days in rats, with or without MCT administration at day 0. As compared to the control group, the MCT group showed a significant increase of PAP (36 mmHg vs 16.3 mmHg). When combined to PFT treatment no difference was seen between the MCT and the MCT+PFT groups (36 mmHg vs 31.6 mmHg) (figure 3A). However, chronic rats treatment with PFT alone significantly increased the PAP compared to control rats receiving vehicle (29 mmHg vs 16.3 mmHg).

In agreement with hemodynamic parameters, the right heart hypertrophy index and the muscularization of distal pulmonary arteries showed a significant increase in the MCT and the MCT+PFT groups but also in the PFT group (figures 3B and 3C). Moreover, statistical comparisons of the three treated groups (Tukey post-tests) revealed that the combination of treatments (MCT+PFT) increased the cardiac hypertrophy and the PA muscularization compared to MCT and PFT given alone.

In line with the muscularization of distal pulmonary arteries, the PA-SMCs proliferation within the arterial wall (PCNA staining) and accumulation of collagen fibers (blue staining in Masson trichrome coloration) were increased in the PFT, MCT and MCT+PFT groups, compared to the control group (figure 3D). However, infiltration of macrophages (red CD68 staining) was observed in the MCT group (figure 3D-F) and the MCT+PFT group (figure 3D-L) but not in the PFT group (figure 3D-I), suggesting that PFT did not interfere with the inflammatory process.

Effects of PFT on human PA-SMCs growth and apoptosis

To evaluate the direct consequence of p53 inactivation by PFT on pulmonary vascular cells growth and apoptosis, we first tested the dose-dependent effect to PFT on human PA-SMCs growth with MTT assays. As illustrated in figures 4A and 4B, PFT increased PA-SMCs

growth at 50 μM and protected cells against cell death induced by etoposide, a cellular stress known to induce p53 (figure 4B-E). Owing to these first results, we used the 50 μM concentration to evaluate the effect of PFT on PA-SMCs apoptosis with TUNEL assays. As shown in figures 4C and 4D, PFT had an anti-apoptotic effect on PA-SMC, an effect which was more marked in the presence of H_2O_2 , a well-known apoptosis inducer. We tested increasing doses of H_2O_2 and 150 μM was associated to maximum of apoptosis in this assay. At this dose, a significant increase of TUNEL positives cells was shown in solvent condition ($p=0.0411$) but not with PFT ($p=0.0960$). Moreover, number of TUNEL positives cells decreased significantly with PFT in basal condition ($p=0.0428$) and in presence of H_2O_2 ($p=0.0047$).

Discussion

Our study demonstrated that MCT-induced PH in rats was associated with an early decrease of p53 expression, which occurred before the PH development. This reveals that down-expression of p53 could be an initiating phenomenon of PH pathogenesis. Indeed pathological hemodynamics changes occurred from the 14th day after MCT administration (Meyrick *et al.*, 1980). Similarly, the down-expression of the transcriptional p53 target p21 was also observed in the first week indicating a deregulation of cell cycle at this stage, allowing an excessive and uncontrolled pulmonary cellular proliferation, leading to the development of PH. However MCT seems to have no effect on BAX protein levels in rat lungs in the studied stages suggesting that p53-BAX pathway was not involved in the pathogenesis of PH in this experimental model. Also, we did observe a significant decrease of MDM2 protein level, the main p53 regulator (Haupt *et al.*, 1997; Toledo *et al.*, 2006). These results suggest that MCT-induced PH is associated to a direct alteration of p53 expression and regulation.

From 14th day, when PH was established, the expressions of p53, p21 and MDM2 were normalized. These results suggest that the alteration of the p53 pathways play a key role at the initiation stage of MCT-induced PH. Our data are consistent with those of Mouraret *et al.* in which no difference in p53 protein level was seen between chronic hypoxia-induced PH mice and control mice (Mouraret *et al.*, 2013).

Because the mechanism by which MCT-induced PH is complex (Rosenberg *et al.*, 1988), and to investigate the direct role of p53 in the pathogenesis of PH, we chose to investigate the consequence of the inhibition of p53 activity by using the PFT, which was originally developed to reduce side-effects of aggressive cancer therapies (Komarov *et al.*, 1999). Interestingly, in our rat model, daily administration of PFT for two weeks not only aggravated the MCT-induced PH, but the drug alone was sufficient to induced PH, revealed by an

increase of PAP, right cardiac hypertrophy and small pulmonary arteries muscularization. This effect was related to *in situ* PA-SMCs proliferation and accumulation of collagen. These results suggested that the inactivation of p53 alone might be a trigger of PH. This conclusion is not consistent with the work of Mizuno et al. in which the knockdown of p53 in mice was associated to a more severe PH than wild-type mice in response to chronic hypoxia, but the animals did not develop a spontaneous PH under normoxic environment (Mizuno *et al.*, 2011). These differences may be related to the species and or to the compensatory mechanisms often observed in transgenic models.

In both human and experimental PH, PA-SMCs play a central role in development and progression of the disease. Recently we demonstrated the relationship between telomere length, p53 and the excessive PA-SMCs growth in iPAH (unpublished data). Here we investigated the pharmacological p53 inactivation by PFT on PA-SMCs growth and resistance to apoptosis. Clearly, the cells treatment with 50 μ M PFT increased PA-SMCs growth under basal condition and protected cells from death induced by etoposide, known to induce p53 activation. Moreover, PFT protected PA-SMCs against apoptosis in basal conditions and in presence of H₂O₂.

This work demonstrated clearly the key role of p53 in maintaining the balance of human PA-SMCs growth/apoptosis and in the initiation stage of PH development in the MCT model. Even beyond, the inactivation of p53 is sufficient to induce development of experimental PH.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Agence National de la Recherche (ANR-08-GENOPAT-004 to S.E., A.L-V and M.H.), Leg Poix (Chancellerie de Paris), CORDDIM (Region Ile de France). The “Telomeres and Cancer” laboratory is a team labeled “Ligue Contre le Cancer” and CODDIM

Disclosures

None conflict of interest.

Significance

Owing to the tumor suppressor properties of p53 and the cancer-like phenotype described in pulmonary arterial hypertension (PAH), p53 has recently interest the PAH community but its involvement in PAH pathogenesis is not presently clear. In our animal studies, we showed that pharmacological inactivation of p53 by pifithrin- α is sufficient to induce PAH in 14 days, an effect related to anti-apoptotic and pro-proliferative properties. Moreover the p53 pathway was down-expressed in the first week in the monocrotaline PH model.

These *in vivo* experiments implicate the p53 pathway plays in the initiation stage of PAH pathogenesis.

References

1. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54:S43-54
2. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:4306-4313
3. Archer SL, Weir EK, Wilkins MR. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: New concepts and experimental therapies. *Circulation*. 2010;121:2045-2066
4. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;43:13S-24S
5. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: Critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*. 2006;113:1857-1864
6. Sakao S, Tatsumi K. Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: Multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. *International journal of cardiology*. 2011;147:4-12
7. Rai PR, Cool CD, King JA, Stevens T, Burns N, Winn RA, Kasper M, Voelkel NF. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178:558-564
8. Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tuder RM. Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest*. 1998;114:225S-230S
9. Adnot S, Eddahibi S. Lessons from oncology to understand and treat pulmonary hypertension. *International journal of clinical practice. Supplement*. 2007:19-25
10. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Puttagunta L, Michelakis ED. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115:1479-1491
11. Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: A mitochondria-ros-hif-1alpha-kv1.5 o2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2008;294:H570-578
12. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-331
13. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-310
14. Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Alhussaini A, Gomez-Arroyo J, Voelkel NF, Ishizaki T. P53 gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300:L753-761
15. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of mdm2. *Science*. 2004;303:844-848

16. Mouraret N, Marcos E, Abid S, Gary-Bobo G, Saker M, Houssaini A, Dubois-Rande JL, Boyer L, Boczkowski J, Derumeaux G, Amsellem V, Adnot S. Activation of lung p53 by nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation*. 2013;127:1664-1676
17. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108:1141-11518. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of crotalaria pulmonary hypertension: Hemodynamic and structural study. *The American journal of physiology*. 1980;239:H692-702
19. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387:296-299
20. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: In vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer*. 2006;6:909-923
21. Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American journal of physiology*. 1988;255:H1484-1491
22. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*. 1999;285:1733-1737

Legends

Figure 1: p53 and targets expression in rats lungs during the development of MCT-PH.

A: Illustrations of representative western immunoblots.

B-E: p53, p21, Bax and MDM2 protein levels in rats lungs. Lungs were removed at day 1, day 3, day 7, day 14 and day 21 after the monocrotaline injection (day 0). Values represented means \pm SEM of the protein level / actin level quantification (n=5). *p<0.05; **p<0.01 vs. Control group (Mann-Whitney tests).

Figure 2: Effective inhibition of p53 activity with PFT in rats lungs.

A: Illustrations of representative western immunoblots.

B-D: Effect of chronic PFT treatment on p53, p21 and Bax protein levels in rats lungs. Values represented means \pm SEM of the protein level / actin level quantification (n=5). **p<0.01 vs. Control group (Mann-Whitney tests).

Figure 3: Consequence of p53 inactivation with PFT on PH development in rats.

A: Hemodynamic measurements (PAPm value in mmHg) obtained in rats treated respectively with MCT, PFT, MCT+PFT or vehicle (corresponding to Control group).

B: Right ventricular hypertrophy estimated by the right ventricle/left ventricle+septum weight ratio (Fulton index).

C: Muscularization state of pulmonary arteries categorized as non-muscular (NM), partially muscular (PM) and muscular (M) according to the media thickness.

Values are means \pm SEM (n=5). Statistics: **p<0.01; ***p<0.001 vs. Control group (Dunnett post-tests). ‡ p<0.05 vs. MCT group and # p<0.05 vs. PFT group (Tukey post-tests).

D: Immunostainings on lung sections of rats treated with MCT (images D, E, F), PFT (images G, H, I), MCT+PFT (images J, K, L) or vehicle (images A, B, C) to detect: cell proliferation (PCNA immunostainings, images A, D, G, J), matrix accumulation (Masson trichrome, images B, E, H, K) and macrophage infiltration (red CD68 combined to green actin immunostainings) (images C, F, I, L).

Scale bars: 50 μ m.

Figure 4: Pro-proliferative and anti-apoptotic effects of PFT in human control PA-SMCs.

A: Growth of PA-SMCs in response to increasing doses of PFT (1, 10, 50 μ M), evaluated by MTT assays. Values are means \pm SEM of 4 experiments. ***p<0.001 vs. corresponding Base (Dunnett post-tests).

B: Illustrations of morphological protecting effect of increasing doses of PFT (1 μ M: image C, 10 μ M: image D, 50 μ M: image E) against cellular death induced by etoposide (image B). Image A = non treated condition. Scale bar: 37,5 μ m.

C: Effect of PFT treatment (50 μ M) on PA-SMCs apoptosis induced by H₂O₂ (150 μ M) evaluated by TUNEL assays. The ratio TUNEL positives cells / total cells was calculated in each well and values are means \pm SEM (expressed in percentages) of 4-6 experiments.

* $p < 0.05$ between H₂O₂ and Base (unpaired t-tests); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ between PFT and solvent (paired t-tests).

D: Illustrations of apoptosis assays with red TUNEL staining and blue DAPI staining. Images A and C illustrate solvent condition, respectively without and with 150 μ M H₂O₂ treatment. Images B and D illustrate 50 μ M PFT condition, respectively without and with 150 μ M H₂O₂ treatment.

Scale bars: 50 μ m.

Figure 1: p53 and targets expressions in rats lungs during the development of MCT-PH.

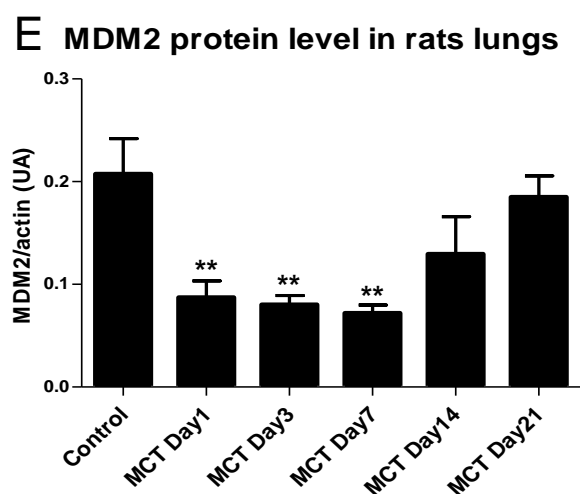
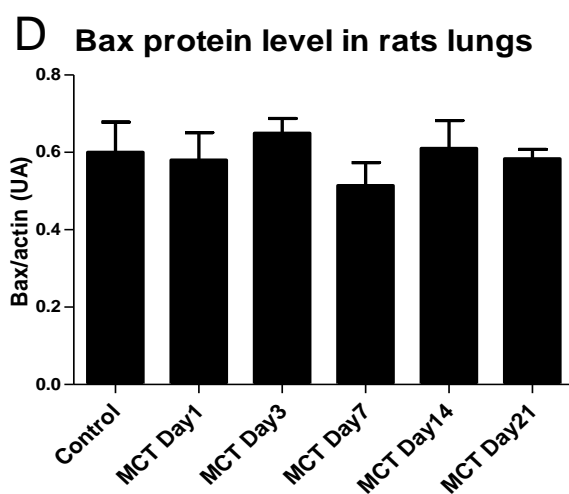
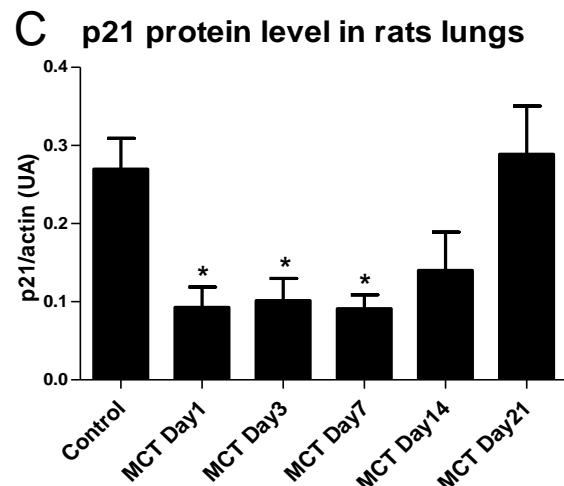
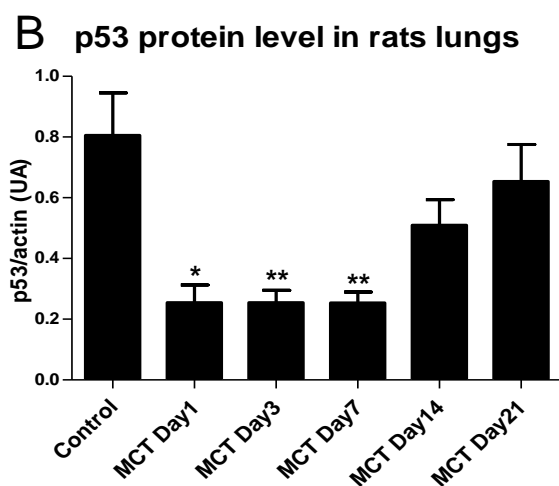
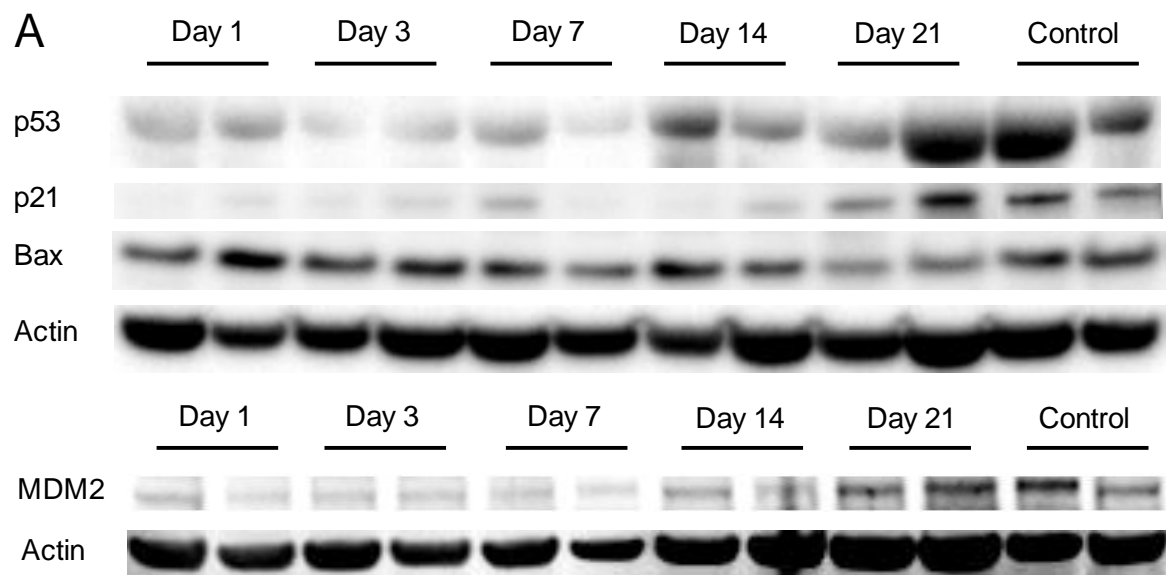


Figure 2: Effective inhibition of p53 activity with PFT in rats lungs.

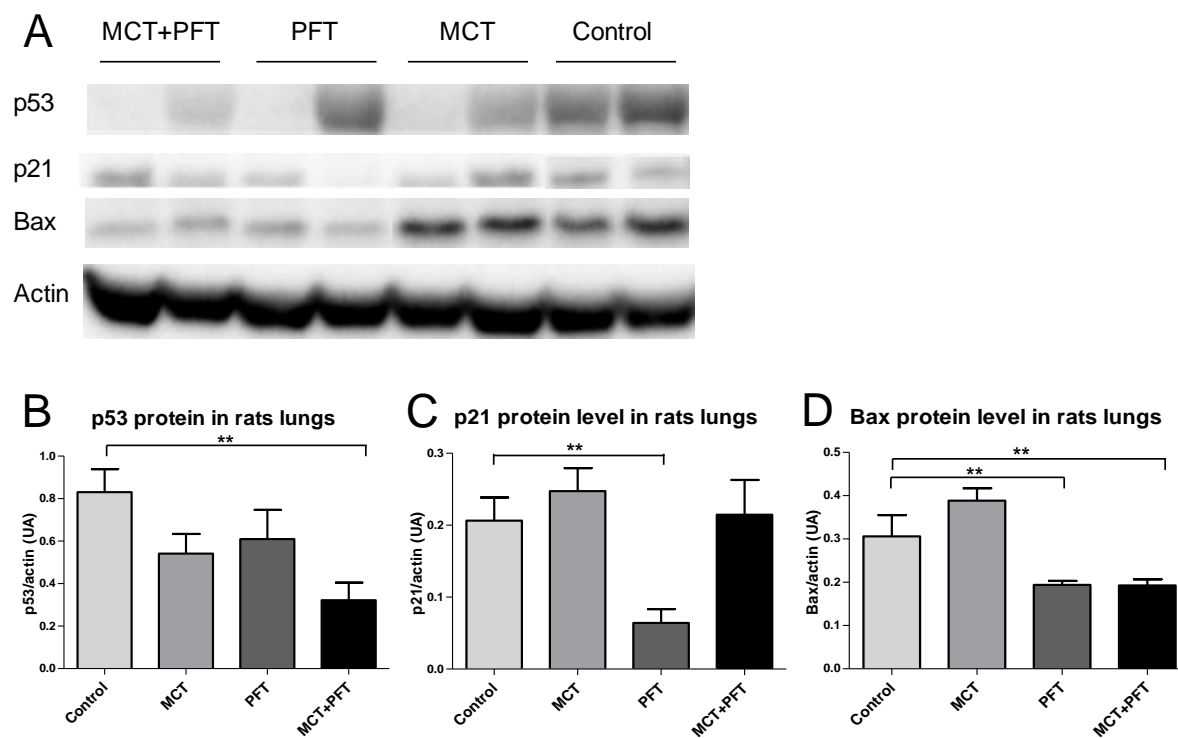


Figure 3: Consequence of p53 inactivation with PFT on PH development in rats.

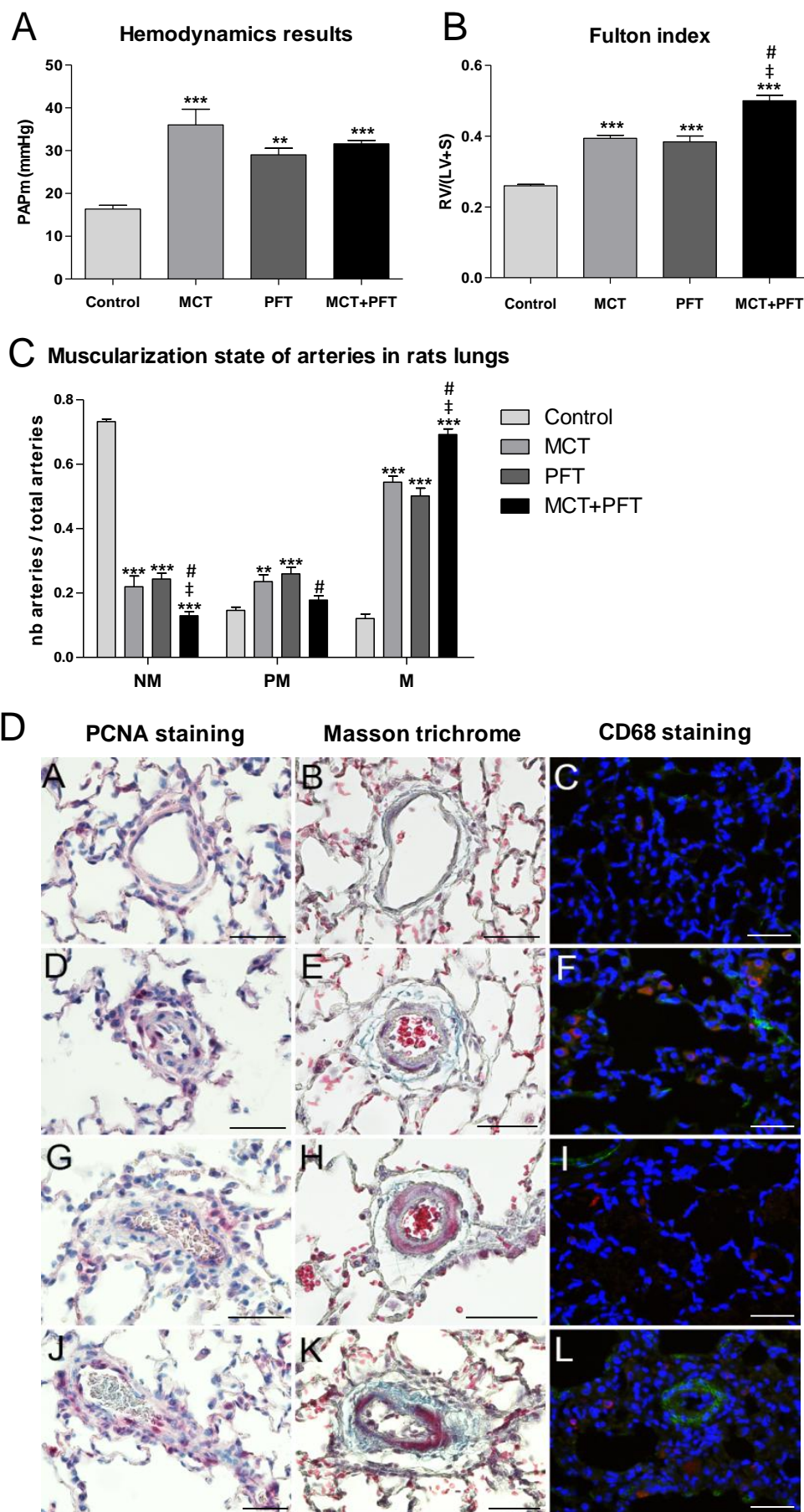
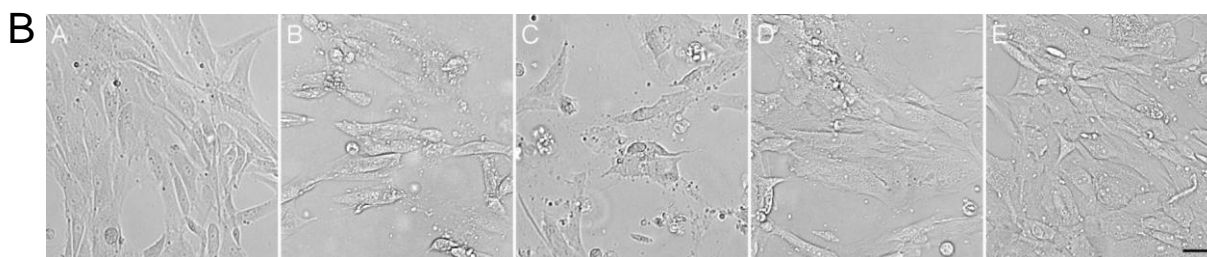
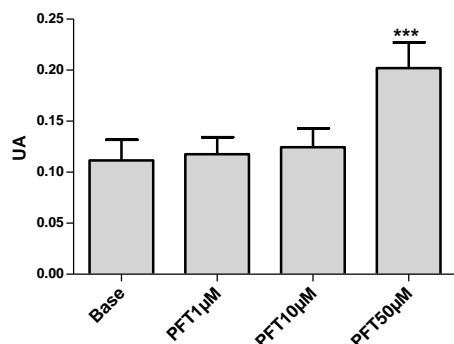
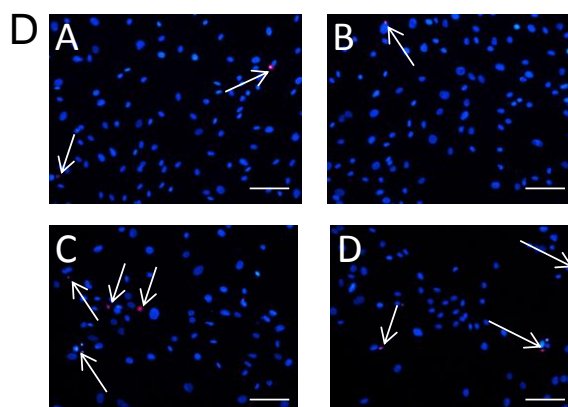
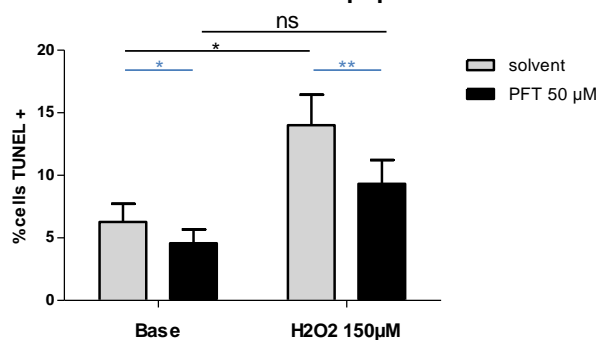


Figure 4: Pro-proliferative and anti-apoptotic effects of PFT in human control PA-SMCs.

A PFT effect on PA-SMCs proliferation



C PFT effect on PA-SMCs apoptosis



Partie 2: Expression de p53 dans les cellules musculaires lisses vasculaires dans l'HTAPi humaine

1 Introduction

Les caractéristiques pseudo-tumorales décrites dans la physiopathologie de l'HTAP humaine ces dernières années nous suggèrent d'évaluer l'implication de voies altérées dans les cellules cancéreuses dans le but de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP humaine pour améliorer la survie et la qualité de vie des patients souffrant de cette pathologie grave. Dans ce contexte, nous sommes intéressés à la voie de la protéine p53 qui est inactivée dans la plupart des cancers permettant aux cellules cancéreuses d'acquiescer un avantage sélectif par rapport aux cellules saines.

Nous avons vu précédemment que le rôle de p53 dans l'HTAP a d'ores et déjà été étudié dans quelques études expérimentales d'HTAP induite dans des modèles *in vivo* murins, et dans la première partie des résultats de nos travaux de recherche, nous avons clarifié l'implication de p53 dans le développement de l'HTAP expérimentalement induite par la MCT chez des rats, en démontrant que l'inactivation de la voie de p53 joue un rôle important dans l'initiation du développement de l'HTAP expérimentale. En revanche, jusqu'alors, personne n'a étudié p53 dans l'HTAP humaine.

Etant donné que les CML-AP jouent un rôle primordial dans le remodelage vasculaire pulmonaire de l'HTAP humaine et qu'elles présentent des caractéristiques communes avec les cellules cancéreuses (hyper-prolifération, résistance à l'apoptose, désordres métaboliques et instabilité génomique), notre premier objectif a été d'étudier la voie de p53 dans ces cellules (CML-AP HTAPi vs. contrôles). Nous avons ainsi effectué une analyse complète de p53 depuis la recherche de mutation dans sa séquence génétique à son expression protéique en passant par son expression génique. Nous avons également évalué son activité transcriptionnelle et sa régulation par MDM2.

Notre second objectif a été d'étudier l'activation de p53 dans les CML-AP (HTAPi vs. contrôles) en analysant la réponse à des stress cellulaires connus pour induire p53. En particulier, le potentiel thérapeutique de l'activation de p53 par la Nutlin-3a a été évalué sur ces cellules humaines.

Enfin, nous avons également cherché à déterminer l'implication d'une protéine homologue de p53: la protéine p73 dans les CML-AP HTAPi *vs.* contrôles, à l'état basal et en condition de stress, en parallèle d'une évaluation *in situ* sur des poumons de patients.

2 Résultats

2.1 La voie de p53 dans les CML-AP humaines HTAPi versus contrôles

L'analyse du séquençage du gène *TP53* dans des CML-AP HTAPi n'a pas permis de mettre en évidence de mutation dans les parties codantes du gène, notamment aucune mutation n'a été relevée au niveau des « *hot spots* » de mutations décrits dans les cancers dans la partie centrale de p53 de liaison à l'ADN. En revanche, une substitution d'un nucléotide (G à la place d'un C) au niveau du codon 72 de l'exon 4 (codant pour une arginine à la place d'une proline) a été observée chez 8 HTAPi sur 10 (Figure 24). Cette variation de séquence correspond à un SNP connu, référencé « rs1042522 », mais pour lequel il n'y a pas de clair consensus quant à son impact sur le risque de cancer. Dans tous les cas, il faudrait analyser cette séquence dans des CML-AP contrôles pour savoir si la variation n'est retrouvée que dans les HTAPi, d'autant plus que chez les caucasiens le variant Arg72 est celui le plus fréquemment retrouvé.

L'expression génique de p53, évaluée par RT-qPCR, n'était pas différente entre CML-AP HTAPi et contrôles (Tableau 7). Nous n'avons pas non plus identifié de différence significative du taux d'ARNm des régulateurs de p53 (MDM2 et MDM4). Afin d'évaluer l'activité transcriptionnelle de p53 et de déterminer si une voie régulée par p53 était potentiellement altérée dans les CML-AP HTAPi, nous avons analysé l'expression génique d'une vingtaine de ses cibles transcriptionnelles impliquées dans divers processus cellulaires; cependant aucune différence significative n'a été obtenue entre CML-AP HTAPi et contrôles.

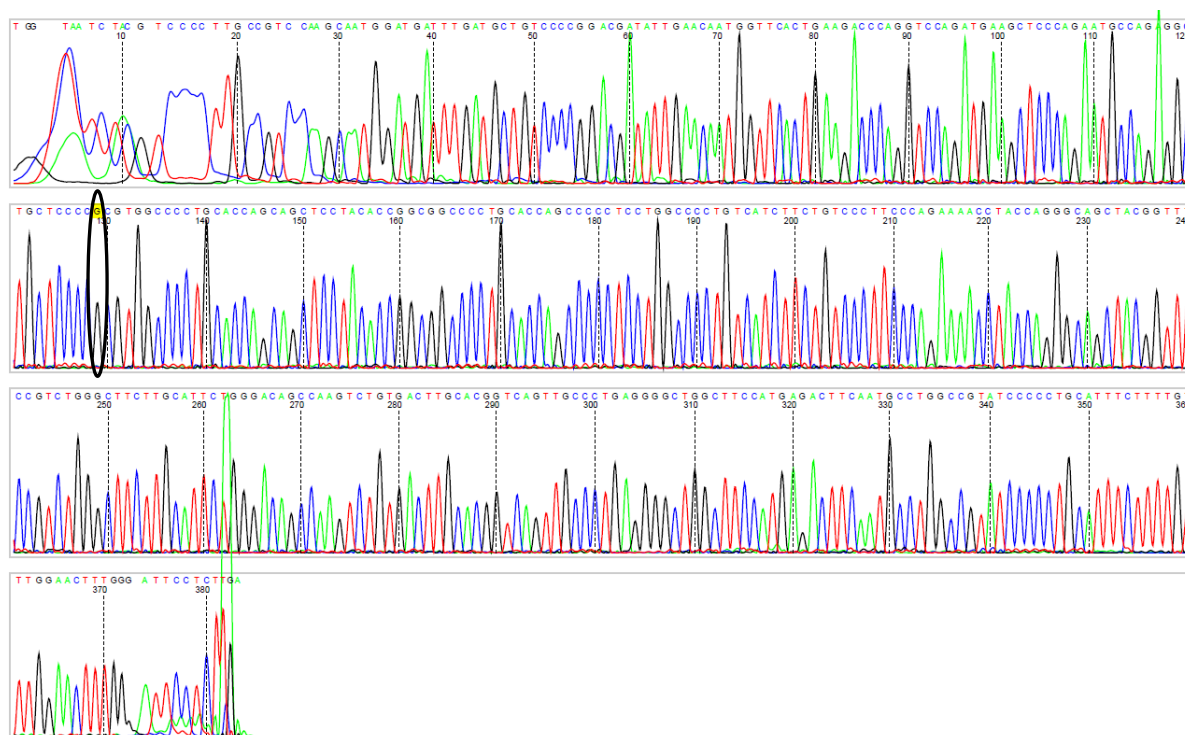


Figure 24: Séquençage du gène *TP53* dans des CML-AP HTAPi. Illustration de la séquence obtenue pour l'exon 4, la substitution au niveau du codon 72 y est signalée par l'ellipse noire.

RT-qPCR results (AU):	Control PA-SMCs			HTAP PA-SMCs			Statistical test
	mean	sem	n	mean	sem	n	
P53	4,40E-05	7,44E-06	12	5,60E-05	4,56E-06	8	ns
MDM2	2,00E-04	3,34E-05	12	1,70E-04	2,12E-05	8	ns
MDM4	1,48E-05	1,78E-06	12	1,44E-05	1,25E-06	8	ns
P21	2,57E-04	3,02E-05	12	1,99E-04	3,46E-05	8	ns
TP53INP1	9,30E-06	1,45E-06	11	1,09E-05	1,72E-06	8	ns
AURKA	7,42E-06	2,18E-06	12	5,35E-06	1,63E-06	8	ns
BAX	6,56E-05	4,60E-06	11	7,01E-05	6,57E-06	8	ns
PUMA	4,83E-06	6,76E-07	11	5,15E-06	4,96E-07	8	ns
NOXA	1,42E-05	5,96E-06	12	1,08E-05	2,60E-06	8	ns
CYR61	1,01E-03	1,20E-04	12	9,27E-04	2,22E-04	8	ns
NRP1	2,49E-04	2,76E-05	12	2,13E-04	4,36E-05	8	ns
PGF	2,42E-06	6,65E-07	12	2,84E-05	1,55E-05	8	ns
PDGFA	5,74E-06	8,94E-07	12	1,40E-05	6,31E-06	8	ns
NOTCH1	3,56E-06	5,77E-07	12	4,68E-06	1,35E-06	8	ns
CRIP2	4,50E-05	6,28E-06	12	4,57E-05	1,14E-05	8	ns
ZC3H12A	1,54E-05	6,09E-06	12	8,32E-06	2,03E-06	8	ns
PTK2	3,87E-05	2,26E-06	11	3,48E-05	4,61E-06	8	ns
ARHGAP24	5,67E-06	9,13E-07	12	6,53E-06	1,03E-06	8	ns
HIF3A	5,01E-07	2,05E-07	12	2,28E-07	1,03E-07	8	ns
VEGFA	2,23E-04	2,97E-05	12	1,66E-04	3,16E-05	8	ns

Tableau 7: Expressions géniques de p53, de certaines de ses cibles et de ses principaux régulateurs dans les CML-AP contrôles et HTAPi. Les tests statistiques réalisés sont des tests Mann-Whitney.

Les niveaux d'expression protéique de p53, de sa forme phosphorylée et de deux de ses cibles, p21 et BAX, n'étaient pas non plus différents entre CML-AP HTAPi et contrôles; en revanche, l'expression protéique de MDM2 était significativement augmentée dans les CML-AP HTAPi, suggérant une dysfonction dans la régulation de p53 par MDM2 dans les CML-AP HTAPi (Figure 25).

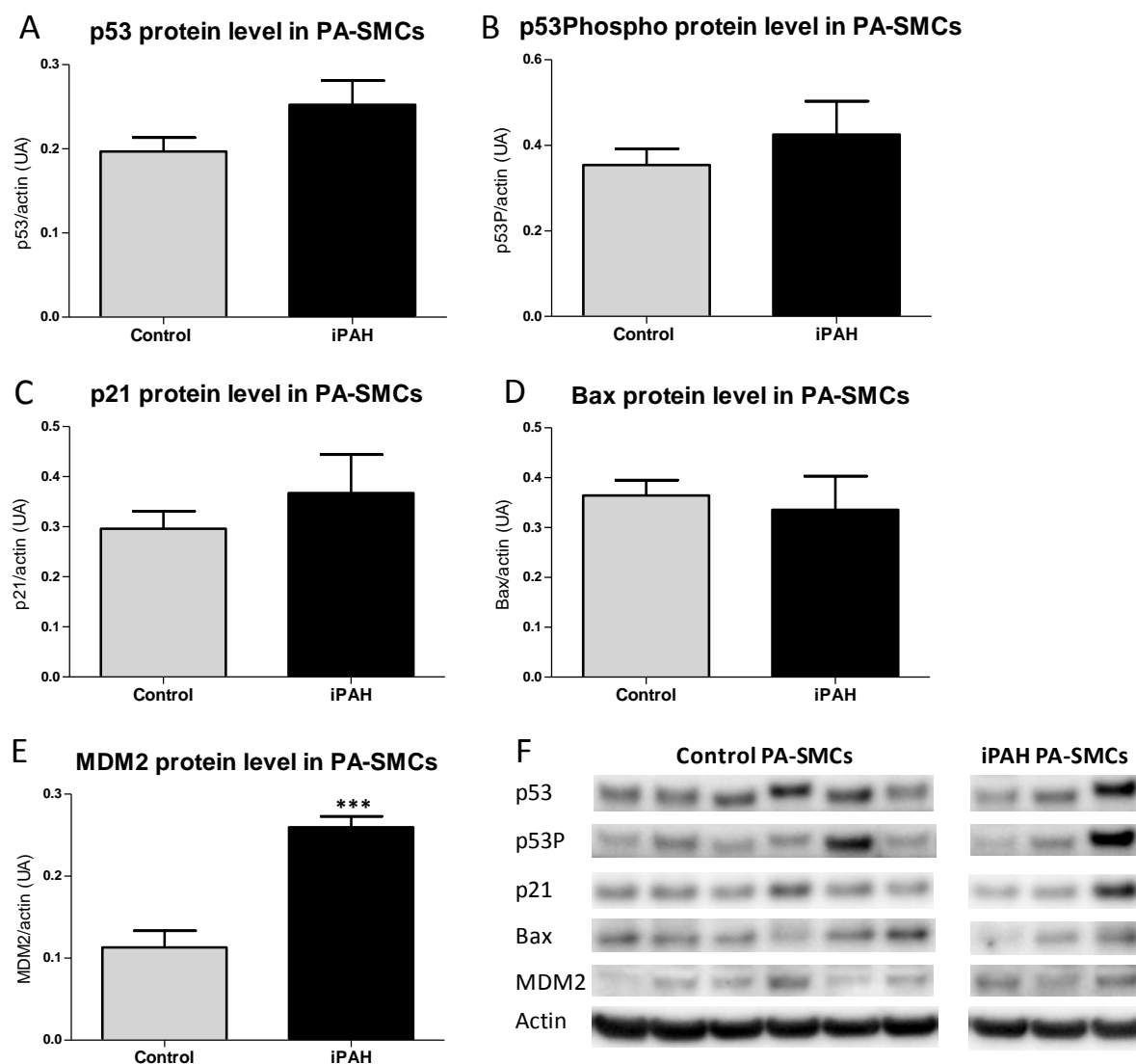


Figure 25: Expression protéique de la voie de p53 dans les CML-AP contrôles et HTAPi.

A-E: respectivement taux protéiques de p53, p53 phosphorylée (serine 15), p21, Bax et MDM2 dans les CML-AP évalués par western-blots. Les colonnes grises représentent les CML-AP contrôles (n=12) et les colonnes noires les CML-AP HTAPi (n=6). Les valeurs correspondent aux moyennes \pm SEM du taux protéique de la protéine d'intérêt / le taux protéique de l'actine.

*** $p < 0.001$ vs. CML-AP contrôles (tests Mann-Whitney).

F: Illustrations représentatives des blots obtenus.

Confirmant l'expression cellulaire de p53, l'immunomarquage réalisé sur coupes de poumons de patients ne révèle pas de différence d'expression de p53 entre les artères pulmonaires de patients contrôles et HTAPi (Figures 26A et 26B).

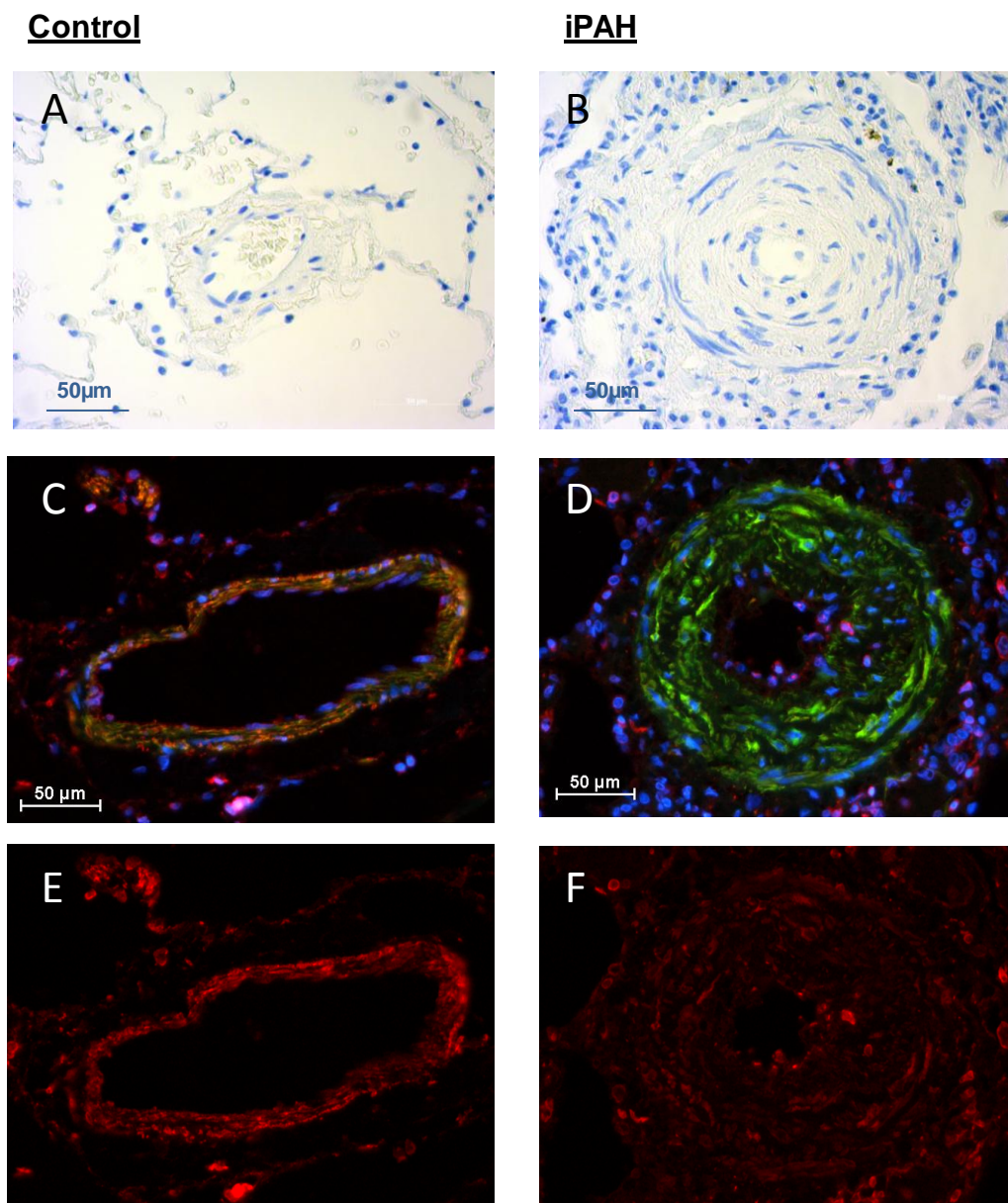


Figure 26: Expressions de p53 et de TAp73 dans des artères pulmonaires de patients contrôles et HTAPi.

A, C et E représentent des AP contrôles; B, D et F représentent des AP remodelées HTAPi.

A, B: Illustrations représentatives du marquage IHC p53 révélé par des substrats DAB.

C, D: Illustrations représentatives du marquage IHC TAp73 révélé par des substrats fluorescents. Les images sont des superpositions des trois fluorophores utilisés: TAp73 en rouge, les fibres d' α -actine en vert et les noyaux en bleu.

E, F: Illustrations du marquage rouge TAp73.

2.2 Impact de stress cellulaires sur l'activation de la voie de p53 dans les CML-AP humaines HTAPi versus contrôles et potentiel thérapeutique de la Nutlin-3a

Au cours de nos premières observations dans les CML-AP humaines, la voie de p53 ne semble pas altérée dans l'HTAPi, ou du moins pas en condition basale. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il s'agirait plutôt d'une possible dérégulation de la capacité d'activation de p53 dans les CML-AP HTAPi. Par conséquent, afin d'étudier cette capacité d'activation de p53 dans les CML-AP, nous avons testé trois conditions de stress: un stress génotoxique avec l'étoposide, un stress oxydatif avec l'H₂O₂ et l'activation directe de p53 avec la Nutlin-3a qui inhibe la liaison p53-MDM2 et protège ainsi p53 de sa dégradation. Cette dernière condition nous a également permis d'évaluer le potentiel thérapeutique de la Nutlin-3a dans les CML-AP HTAPi humaines.

Les stress cellulaires utilisés ont activé la voie de p53 en augmentant significativement le taux protéique de p53 dans les CML-AP contrôles et HTAPi, excepté en réponse à l'H₂O₂ dans les CML-AP HTAPi ($p=0.0625$) (Figure 27A). Les stress cellulaires ont également induit une augmentation significative de l'expression protéique de la forme phosphorylée de p53 (en sérine 15) (Figure 27B), signe d'une activation effective de p53 dans les CML-AP contrôles et HTAPi. Similairement à p53, le profil d'expression protéique de p21 est augmenté en réponse aux stress cellulaires, excepté en réponse à l'H₂O₂ dans les CML-AP HTAPi ($p=0.3125$) (Figure 27C). Concernant une autre cible de p53 qu'est BAX, l'augmentation significative de son taux protéique n'a été obtenue qu'en présence de la Nutlin-3a dans les CML-AP HTAPi ($p=0.0313$) (Figure 27D). L'analyse de l'expression protéique du régulateur de p53 qu'est MDM2 révèle une augmentation significative en réponse à la Nutlin-3a dans les CML-AP contrôles et HTAPi (Figure 27E).

La comparaison statistique des réponses aux stress cellulaires entre CML-AP contrôles et HTAPi avec des tests Mann-Whitney n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les deux groupes pour les protéines d'intérêt étudiées.

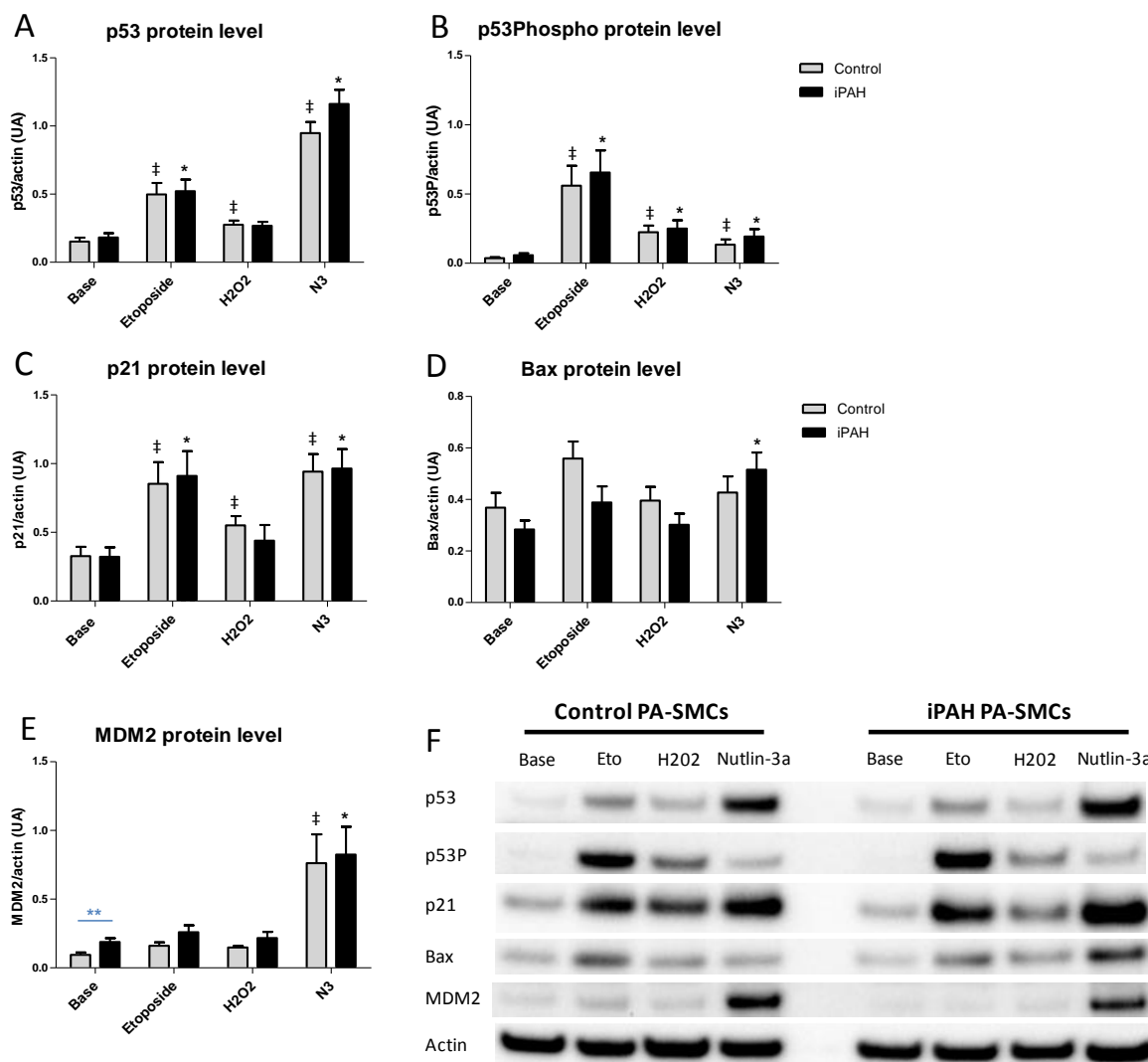


Figure 27: Expression protéique de la voie de p53 en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi.

A-E: respectivement taux protéiques de p53, p53 phosphorylée (serine 15), p21, Bax et MDM2 dans les CML-AP évalués par western-blots. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec trois stress différents: l'étoposide (Eto), l'H₂O₂ et la Nutlin-3a (N3). Les colonnes grises représentent les CML-AP contrôles et les colonnes noires les CML-AP HTAPi. Les valeurs correspondent aux moyennes ± SEM du taux protéique de la protéine d'intérêt / le taux protéique de l'actine (n=5-8).

* p<0.05 vs. iPAH Base (tests Wilcoxon); ‡ p<0.01 vs. Control Base (tests Wilcoxon); ** p<0.01 vs. Control Base (tests Mann-Whitney).

F: Illustrations représentatives des blots obtenus.

Nous avons également étudié l'effet des stress cellulaires sur la translocation nucléaire de p53, grâce à un marquage immunofluorescence de p53 dans les CML-AP. A l'état basal, la protéine p53 n'est pratiquement pas localisée dans les noyaux, que ce soit dans les CML-AP contrôles et dans les CML-AP HTAPi, situation classique pour une cellule non stressée. La protéine p53 est alors transloquée au

niveau nucléaire en conditions de stress; dans nos expériences, cette translocation (nombre de noyaux p53 positifs) était particulièrement importante en réponse à la Nutlin-3a pour les CML-AP contrôles ainsi que pour les CML-AP HTAPi. La réponse à l' H_2O_2 était cependant moindre dans les CML-AP HTAPi (Figure 28).

Suite à l'activation de p53, la prolifération/viabilité cellulaire a été diminuée en réponse aux stress dans les CML-AP contrôles et HTAPi, de manière statistiquement significative avec l' H_2O_2 et la Nutlin-3a (Figure 29). Les résultats obtenus en réponse à l' H_2O_2 (pratiquement plus de prolifération) sont dus au fait que presque toutes les cellules étaient mortes, certainement en lien avec la déprivation en SVF pendant 48 heures avant l'application du traitement cellulaire dans ces tests. La Nutlin-3a a présenté un effet anti-prolifératif particulièrement marqué dans les CML-AP HTAPi puisque la prolifération initialement augmentée dans les CML-AP HTAPi (en condition basale) est passée à un taux comparable aux CML-AP contrôles. Ce résultat suggère que les CML-AP HTAPi sont plus sensibles à l'effet anti-prolifératif de la Nutlin-3a que les CML-AP contrôles.

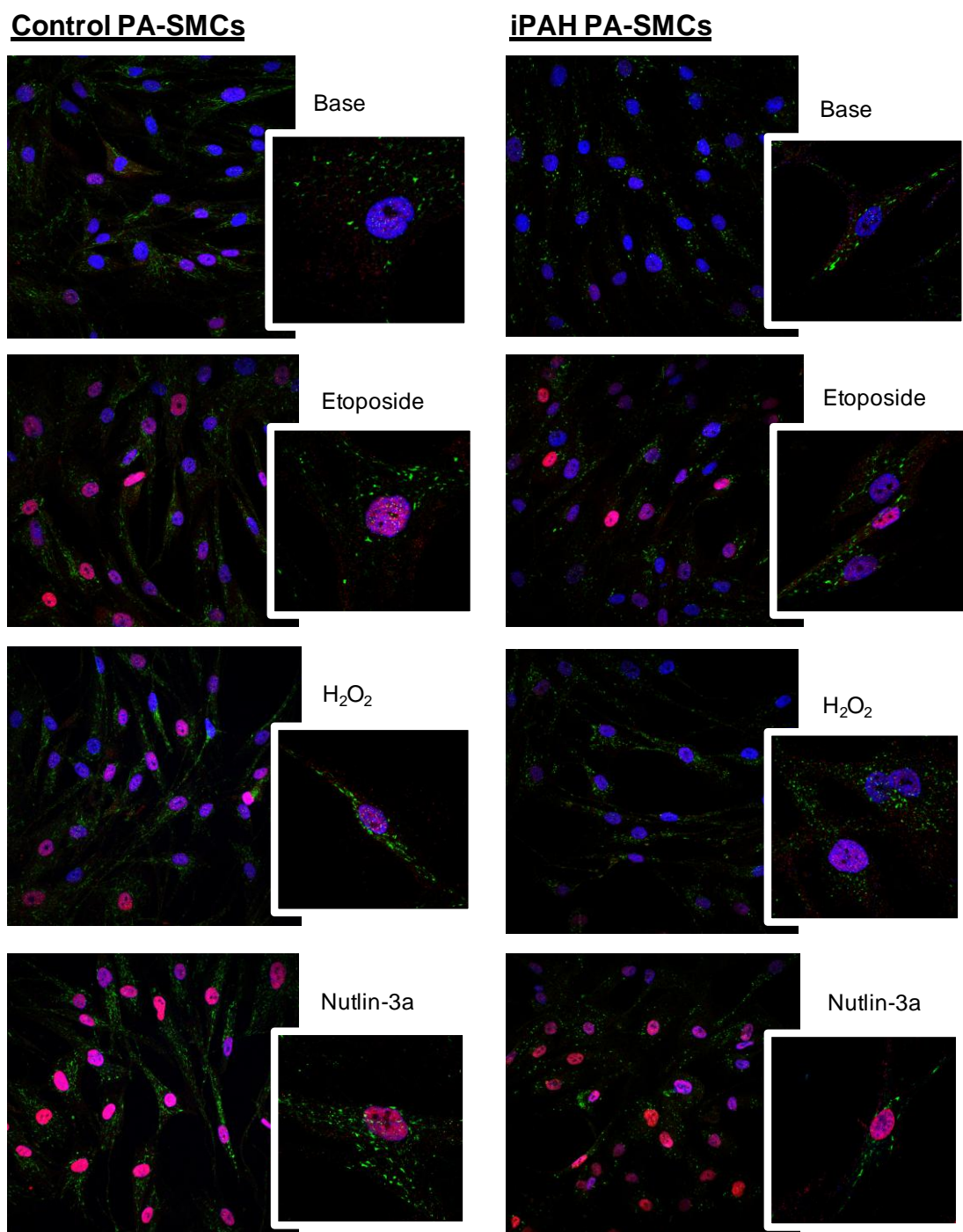


Figure 28: Translocation nucléaire de p53 en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi.

Illustrations du marquage immunofluorescent de p53 dans les CML-AP contrôles (colonne de gauche) et HTAPi (colonne de droite). Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec trois stress différents: l'étoposide, l'H₂O₂ et la Nutlin-3a. Le marquage rouge permet de localiser la protéine p53, le marquage vert les mitochondries (protéine ATP50) et le marquage bleu les noyaux (DAPI). Ces images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal aux grossissements x400 et x630.

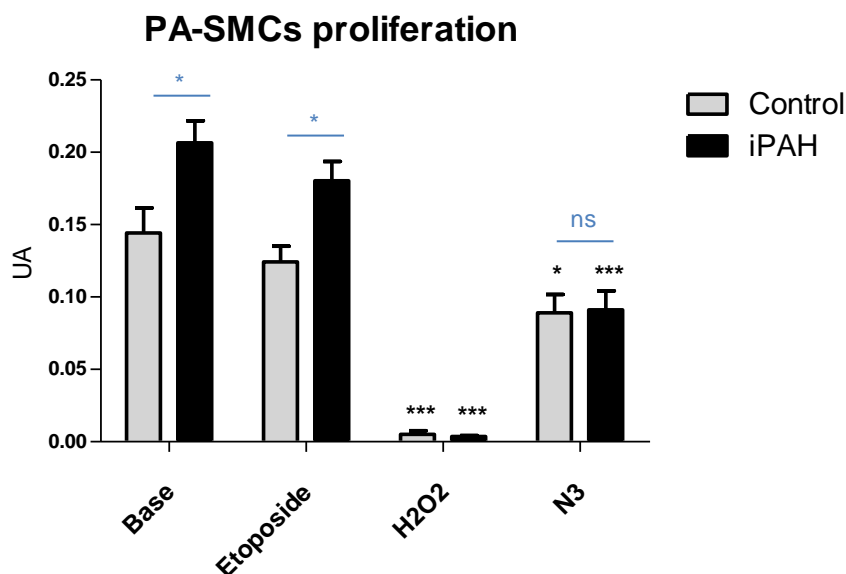


Figure 29: Prolifération/viabilité cellulaire en réponse à des stress cellulaires dans les CML-AP contrôles et HTAPi, évaluée par des tests MTT.

Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec trois stress différents: l'étoposide, l' H_2O_2 et la Nutlin-3a (N3). Les colonnes grises représentent les CML-AP contrôles et les colonnes noires les CML-AP HTAPi. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm SEM de 4 expériences.

* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. Base correspondante (Dunnett post-tests); * $p < 0.05$ entre les CML-AP contrôles et HTAPi (t-tests non appariés avec correction de Welch).

2.3 Etude préliminaire de la protéine p73 dans l'HTAPi humaine

Nous avons étudié deux isoformes de p73: TAp73 aux propriétés proches de p53 et $\Delta Np73$ (aussi appelée dNp73) aux propriétés opposées. Pour les deux isoformes, nous avons analysé une bande localisée à 65 kDa sur les immuno-blots obtenus, correspondant probablement à la forme α C-terminal. Les résultats préliminaires des western-blots semblaient indiquer que le taux protéique de ces deux isoformes n'était pas différent dans les CML-AP contrôles et HTAPi en condition basale (Figures 30A à 30D). Similairement à p53, nous avons évalué la réponse cellulaire à un stress génotoxique, la cisplatine, connu pour induire TAp73. Nous avons observé une tendance à l'augmentation du taux protéique de TAp73 en réponse à la cisplatine dans les CML-AP contrôles mais pas dans les HTAPi (Figure 30E). Concernant $\Delta Np73$, la cisplatine a diminué significativement son taux protéique dans les CML-AP HTAPi mais pas dans les contrôles (Figure 30F). Cependant, pour les deux isoformes, aucune différence significative n'a été obtenue entre contrôles et HTAPi en comparant les conditions stressées par des tests Mann-Whitney.

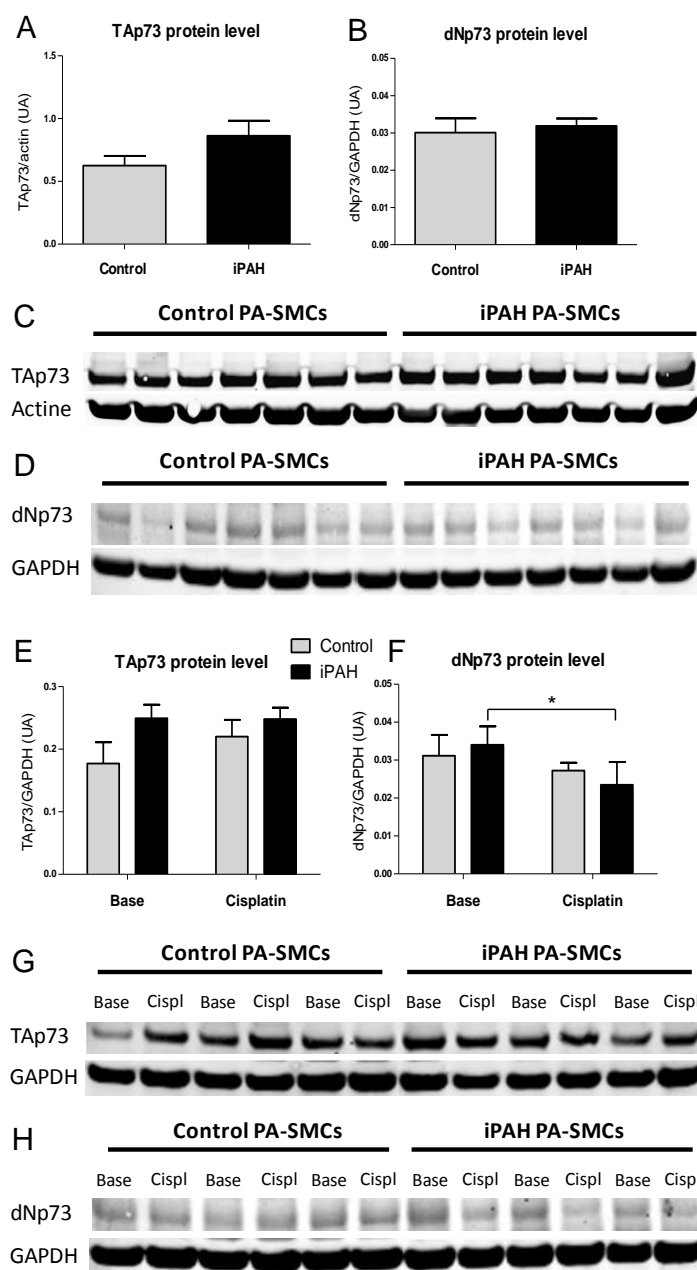


Figure 30: Expressions protéiques de TAp73 et dNp73 dans les CML-AP contrôles et HTAPi, évaluée par western-blots. Les colonnes grises représentent les CML-AP contrôles et les colonnes noires les CML-AP HTAPi.

A, B: respectivement taux protéiques de TAp73 et dNp73 dans les CML-AP en condition basale. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm SEM du taux protéique de la protéine d'intérêt / le taux protéique de l'actine ou de la GAPDH (n=7) (tests Mann-Whitney).

C, D: illustrations représentatives des blots obtenus pour l'évaluation de TAp73 et dNp73 en condition basale.

E, F: respectivement taux protéiques de TAp73 et dNp73 dans les CML-AP traitées pendant 24 heures avec la cisplatine. Les valeurs correspondent aux moyennes \pm SEM du taux protéique de la protéine d'intérêt / le taux protéique de la GAPDH (n=5-6). * p < 0.05 vs. Base (tests Wilcoxon).

G, H: illustrations représentatives des blots obtenus pour l'évaluation de TAp73 et dNp73 en conditions basale et stressée avec la cisplatine (Cispl).

Nous avons également réalisé un immunomarquage TAp73 sur des coupes de poumons de patients. L'analyse des images obtenues révèle une diminution de l'expression de TAp73 dans la média des artères pulmonaires remodelées des patients HTAPi par rapport aux artères non remodelées des patients contrôles (Figures 26C à 26F).

Discussion générale et perspectives

La problématique de ce projet de recherche s'inscrit dans un objectif d'amélioration des connaissances de la physiopathologie de l'HTAP dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette pathologie grave. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés au phénotype pseudo-tumoral décrit ces dernières années dans l'HTAP idiopathique et nous avons émis l'hypothèse que la voie de la protéine p53, un des plus importants suppresseurs de tumeur, pourrait être altérée au cours du développement de l'HTAPi.

Les données d'ores et déjà publiées sur le rôle de la protéine p53 dans l'HTAP ont été obtenues dans des études *in vivo* modélisant l'HTAP chez l'animal et ont révélé des résultats assez discordants quant au niveau d'expression de p53. En effet, une première étude a décrit une augmentation du taux protéique de p53 (associée à une augmentation de p21) dans les poumons de souris exposées à une hypoxie chronique à 10% d'O₂ pendant 8 semaines (Mizuno *et al.*, 2011). A l'inverse, une deuxième étude a montré une diminution du taux protéique de p53 (associée à une diminution de p21) dans les poumons de rats traités à la MCT (analysés à 2 semaines post-injection) ou soumis à une hypoxie chronique de 3 semaines (Ravi *et al.*, 2013). Enfin, une troisième étude a suggéré une augmentation du taux protéique de p53 (associée à une augmentation de p21 et de MDM2) dans les poumons de souris SM22-5HTT+ qui développent spontanément une HTAP, sans observer cependant de modification du taux protéique de p53 (ni de p21, ni de MDM2) dans les poumons de souris exposées à une hypoxie chronique de 3 semaines (Mouraret *et al.*, 2013). Bien que les différences obtenues entre ces trois études puissent s'expliquer, du moins en partie, par les différences dans les modèles employés (variations de protocole, d'espèces, de fond génétique, d'âges des animaux...) et dans les techniques utilisées (variations dans le protocole des western-blots, d'anticorps primaires, de méthode de révélation...), l'implication de p53 dans l'HTAP ne semblait par conséquent jusqu'alors pas clairement établie.

Ainsi, dans la première partie de notre travail, nous avons cherché à éclaircir le rôle de p53 dans le développement de l'HTAP expérimentale. Nous avons choisi d'utiliser le modèle d'HTAP par injection de MCT à des rats. En effet, c'est un des modèles d'HTAP les plus sévères et les plus proches de l'HTAP humaine idiopathique, avec une muscularisation des artères pulmonaires, une inflammation sévère et la présence de micro-trombi dans la microvasculature pulmonaire, associée au développement d'une hypertrophie cardiaque droite (Meyrick *et al.*, 1980; Schultze *et al.*, 1998; Stenmark *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 1989). Au cours du développement de l'HTAP dans ce modèle, nous avons observé une diminution du taux protéique de p53, de sa cible p21 et de son principal régulateur (mais également cible transcriptionnelle) MDM2 lors de la première semaine, suivie d'une normalisation à partir du 14^{ème} jour post-injection de MCT. Ces résultats obtenus sur le tissu pulmonaire total semblent indiquer que la voie de p53 est inactivée dans la phase initiatrice du développement de l'HTAP dans le modèle MCT car elle précède l'augmentation des PAP qui n'a lieu qu'à partir de la deuxième semaine (Meyrick *et al.*, 1980; Rosenberg *et al.*, 1988). En effet, bien que le mécanisme d'induction de l'HTAP par la MCT ne soit pas encore très clairement établi, il est proposé qu'après une phase de bioactivation hépatique de la MCT par le cytochrome P450 3A (Reid *et al.*, 1998), son métabolite déshydrogéné pyrrolique toxique (MCTP) est libéré dans la circulation pulmonaire proche (Pan *et al.*, 1991), où il induit alors ses effets toxiques. Dans un premier temps c'est la fonction endothéliale qui est altérée (Rosenberg *et al.*, 1988), via la formation d'adduits protéiques et de liaison à l'ADN par le MCTP alkylant (Lame *et al.*, 2000; Lame *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 1993). S'en suit une altération de la perméabilité vasculaire et une importante infiltration de cellules inflammatoires (Wilson *et al.*, 1989) et de thrombi plaquettaires (Schultze *et al.*, 1998). Une extension du muscle lisse dans les petites artères pulmonaires normalement non muscularisées apparaît à partir du 8^{ème} jour, qui conduit à l'élévation des PAP à partir du 12^{ème} jour post-injection (Rosenberg *et al.*, 1988). Afin d'analyser le type cellulaire impliqué dans la diminution de p53 que nous avons observée dans les extraits protéiques pulmonaires totaux des rats MCT lors de la première semaine post-injection, nous avons tenté de déterminer la localisation intra-pulmonaire de p53 par des marquages immuno-histochimiques; cependant nous nous sommes heurtés à des difficultés techniques qui ne nous ont malheureusement pas permis de conclure. En perspective de ces résultats obtenus dans

le modèle MCT, il serait intéressant d'étudier la voie de p53 dans un autre modèle d'HTAP de plus en plus utilisé, qui associe injection de Sugen 5416, un inhibiteur des récepteurs au VEGF, à une hypoxie chronique. L'intérêt de ce modèle est qu'il induit le développement d'une HTAP sévère qui se rapproche encore plus de la pathologie humaine avec notamment la formation de lésions complexes intimaux qui ressemblent aux lésions plexiformes (Abe *et al.*, 2010; Stenmark *et al.*, 2009; Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2001; Toba *et al.*, 2014).

Au vu de la diminution de l'expression de p53 au cours de la phase précoce du développement de l'HTAP dans le modèle MCT, nous avons évalué dans un deuxième temps l'impact de l'inactivation pharmacologique de p53 sur le développement de l'HTAP, à l'aide d'un traitement chronique avec le pifithrin- α (PFT) chez des rats. Ce produit a été initialement développé pour réduire les effets indésirables des traitements anti-cancéreux liés à leurs effets cytotoxiques sur les tissus sains adjacents au foyer tumoral. Bien que son mécanisme exact ne soit pas pour l'heure tout à fait avéré, ce composé a été sélectionné sur sa capacité à bloquer l'activité transcriptionnelle de p53 (Komarov *et al.*, 1999). En effet il a été rapporté, dans différents types tissulaires et cellulaires, une diminution de l'expression de certains de ses gènes cibles comme p21, BAX, MDM2, PUMA... en présence de PFT, associée à une diminution de l'apoptose et une augmentation de la survie cellulaire, effets d'autant plus marqués en condition de stress (Kelly *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Pietrancosta *et al.*, 2006; Plesnila *et al.*, 2007; Proietti De Santis *et al.*, 2003; Sohn *et al.*, 2009; Tsuruya *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2002). Ainsi, la diminution significative de l'expression protéique de p21 et BAX dans les poumons des rats traités avec le PFT valide notre modèle d'inactivation transcriptionnelle de p53 avec le PFT. Dans notre groupe doublement traité MCT+PFT, nous avons observé une diminution significative du taux protéique de p53 associée à une diminution significative de BAX mais pas de p21, ce qui suggère une synergie d'effet des deux molécules qui ciblerait particulièrement la fonction apoptotique de p53. De plus, nos observations *in vitro* quant au traitement des CML-AP humaines contrôles avec le PFT corroborent ces résultats, puisque nous avons mis en évidence un effet pro-prolifératif du PFT (en condition basale comme présenté dans les résultats ainsi qu'en présence d'étoposide) et un effet anti-apoptotique du PFT (en condition basale et en présence d'un inducteur d'apoptose, l' H_2O_2). Une

diminution de l'expression protéique de BAX en présence d'étoposide dans les CML-AP traitées avec le PFT a également été observée (données non illustrées dans l'article soumis); l'effet anti-apoptotique du PFT semble donc être également particulièrement important *in vitro*. Dans des études *in vivo*, en plus des effets protecteurs p53-dépendants (non observés chez les souris p53^{-/-}) dans des modèles d'irradiation (qui miment la radiothérapie utilisée dans le traitement des cancers humains), le PFT a été associé à des effets protecteurs dans des modèles de maladies neurodégénératives, d'ischémies cérébrales, d'insuffisances rénales et cardiaques (Gudkov *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'injection quotidienne de PFT pendant 14 jours a induit le développement d'une HTAP, caractérisée par une élévation des PAP, une muscularisation des artères pulmonaires et une hypertrophie cardiaque droite. Ce résultat révèle l'importance de l'inactivation de p53 comme déclencheur de l'HTAP *in vivo*. Comme alternative et de manière complémentaire à l'étude de l'inactivation pharmacologique de p53, on pourrait envisager d'évaluer l'effet d'un siRNA anti-p53 sur le développement de l'HTAP. De plus, afin d'affirmer avec plus de certitudes encore l'implication de p53 dans le développement de l'HTAP, il serait pertinent de vérifier que les effets physiopathologiques observés avec le traitement PFT soient bien p53-dépendants en appliquant le même traitement à des souris p53^{-/-} qui ne devraient alors pas développer d'HTAP. Les effets protecteurs du PFT présentés précédemment n'ont pas du tout été étudiés dans le même cas de figure que notre étude, puisqu'ils ont été obtenus suite à un traitement aigu (mono-injection ou seulement injection de PFT sur 2-3 jours autour de l'opération) à visée thérapeutique dans le cadre de pathologies qui présentent un excès de mort cellulaire (le contraire de l'HTAP). Dans tous les cas, le PFT est toujours associé à une diminution de l'apoptose, bénéfique en aigu, dans le cas de maladies ischémiques par exemple ou pour protéger les cellules saines des traitements anti-cancéreux (pour lesquels le rapport bénéfices/risques consenti n'est d'ailleurs pas le même que pour les autres pathologies), mais potentiellement néfaste en chronique. Dans notre étude *in vivo*, les rats doublement traités avec la MCT et le PFT ont présenté une aggravation de certains paramètres de l'HTAP dont la muscularisation des artères pulmonaires et l'hypertrophie cardiaque droite par rapport aux rats traités seulement avec la MCT ou le PFT. Ces résultats suggèrent une synergie d'effet de ces deux molécules avec des mécanismes d'action potentiellement complémentaires. En effet, on peut penser que la MCT dérègle le cycle cellulaire (au vu de la

diminution du taux protéique de p21 au cours de la première semaine du modèle MCT) et que le PFT induit quant à lui une résistance à l'apoptose (au vu de la diminution du taux protéique de BAX dans les poumons des rats MCT+PFT non observée dans le groupe MCT seul). Par ailleurs, l'hypertrophie cardiaque observée avec le PFT peut être considérée comme secondaire au développement de l'HTAP mais aussi comme un effet propre du PFT au niveau cardiaque (participant à la majoration de l'hypertrophie cardiaque dans le groupe MCT+PFT). En effet, bien qu'en aigu le PFT a amélioré certains paramètres de la fonction cardiaque au cours d'une ischémie/reperfusion myocardique chez le rat (Liu *et al.*, 2006; Mocanu *et al.*, 2003), une étude a montré que le PFT administré en chronique pendant sept jours altérait la fonction cardiaque et augmentait la taille de l'infarctus dans un modèle d'ischémie myocardique chez la souris (Zhang *et al.*, 2011c).

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés sur l'exploration de la voie p53 dans l'HTAPi humaine, et en particulier dans les CML-AP. Comme illustré dans les résultats, nous n'avons pas observé de différence entre CML-AP HTAPi et contrôles, tant aux niveaux de l'expression génique que de l'expression protéique de p53, à l'état basal. A notre connaissance, aucune équipe n'a travaillé jusqu'alors sur p53 dans les CML-AP de patients HTAP, il n'est donc pas évident de comparer ces résultats à d'autres sans effectuer des biais d'interprétation avec d'autres types cellulaires ou d'autres espèces. Mais ceci étant dit, il convient de trouver des explications plausibles dans le but de tenter d'en comprendre la signification clinique (qui est en outre très probablement aussi importante, voire plus importante, que la signification statistique).

Avant tout, il est nécessaire de s'intéresser à une des limites méthodologiques de cette étude qu'il faut avoir en tête afin d'interpréter les résultats de la manière la plus objective possible et qui concerne notre groupe comparateur contrôle et surtout l'origine des CML-AP dites contrôles. En effet, elles proviennent d'artères pulmonaires de patients cancéreux, chez qui a été réalisée une exérèse chirurgicale de leur cancer pulmonaire (par lobectomie ou pneumonectomie). Bien que les artères pulmonaires utilisées en culture aient été récupérées à distance de foyer tumoral, il se peut que la voie de p53 soit également altérée à ce niveau. Cependant il est difficile, pour ne pas dire impossible, de

procéder d'une autre manière pour constituer notre groupe contrôle et d'avoir des artères pulmonaires de personnes « réellement saines », puisque les rares poumons sains disponibles sont alors transplantables à des malades qui en ont un besoin vital. Des précautions ont tout de même été prises étant donné que les artères pulmonaires utilisées ont été analysées et considérées comme ne présentant pas de caractéristiques cancéreuses par des anatomopathologistes expérimentés du Centre Chirurgical Marie Lannelongue. De plus, une fois en culture, les CML-AP dont la prolifération et la morphologie étaient altérées n'ont pas été utilisées dans les expérimentations.

En outre, pour revenir à la discussion des résultats à proprement parler, le fait que nous n'ayons pas observé de différence du taux protéique de p53 entre CML-AP HTAPi et contrôles peut avoir d'autres explications qui sont les suivantes:

- 1- Nous avons vu dans la première partie des travaux que le taux protéique de p53 se normalise à partir de la 2^{ème} semaine au cours du modèle d'induction d'HTAP expérimentale par injection de MCT et qu'au stade tardif de la pathologie nous n'observons plus de différence par comparaison au groupe contrôle. Ainsi par analogie et étant donné que les CML-AP avec lesquelles nous travaillons proviennent de patients HTAP très sévères (puisque les prélèvements sont récupérés au moment de leur transplantation pulmonaire) et par conséquent correspondent à un stade tardif de la pathologie, les résultats observés dans les CML-AP humaines se rapporteraient à la phase de normalisation de p53 et que la possible phase de diminution du taux protéique de p53 soit déjà dépassée. Malheureusement, à l'instar de disposer d'un « réel groupe contrôle », il est impossible de disposer de tissus plus précocement. Par conséquent, en tenant compte des résultats obtenus à la fois dans les CML-AP humaines ainsi que dans les modèles expérimentaux étudiés en première partie, on peut considérer que l'inactivation de p53 est importante dans la phase initiatrice du développement de l'HTAP et que d'autres voies prennent le relai par la suite, pendant les phases effectrices et installées de la pathologie.
- 2- La non-significativité statistique obtenue pourrait également s'expliquer par les importantes variations inter-individuelles observées chez les patients et par le possible manque de puissance de notre étude (pas assez de patients inclus).

- 3- Notre hypothèse de travail initiale était une inactivation de la voie de p53 en raison des caractéristiques communes décrites entre cancer et HTAP, notamment l'hyper-prolifération des CML des artères pulmonaires remodelées dans l'HTAP. Or une augmentation de la prolifération cellulaire n'est pas forcément corrélée à une diminution du taux protéique de p53. En effet, une étude évaluant l'impact de l'hypoxie sur la prolifération de fibroblastes pulmonaires humains a révélé qu'une hypoxie modérée (2% O₂) augmentait la prolifération cellulaire en comparaison à la normoxie (21% O₂) sans diminuer le taux protéique de p53 dans ces cellules. Alors qu'une hypoxie sévère (0,1% O₂) ou une anoxie chimique (par traitement avec un chélateur de fer, la desferroxamine) inhibait la prolifération cellulaire en augmentant cette fois-ci le taux protéique de p53 (Mizuno *et al.*, 2009). D'autres études sur d'autres types cellulaires ont mis en évidence des résultats similaires faisant intervenir HIF-1 α et MDM2 (Alarcon *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 2002; Koumenis *et al.*, 2001; Sermeus *et al.*, 2011). Ainsi on peut penser que dans le cas de l'HTAP, où est décrite en outre une activation normoxique de HIF-1 α , on puisse être dans une situation comparable à l'hypoxie modérée, avec une augmentation de la prolifération cellulaire sans diminution du taux protéique de p53.
- 4- Une récente étude a montré que des marqueurs de dommages à l'ADN étaient augmentés dans les CML-AP de patients HTAP, très probablement en lien avec l'inflammation chronique décrite dans l'HTAP (Meloche *et al.*, 2014). Or cet environnement est propice à une activation de p53. Ainsi dans les CML-AP HTAPi, on peut supposer que l'on soit en présence d'une balance entre activation et inactivation de p53, aboutissant à une normalisation du taux protéique de p53. Au cours d'une autre pathologie vasculaire qu'est l'athérosclérose, il a même été proposé que l'expression de p53 soit augmentée dans les vaisseaux présentant des plaques athérosclérotiques en lien avec une augmentation de marqueurs de dommages à l'ADN (associée à une activation des voies de réparation à l'ADN) (Iacopetta *et al.*, 1995; Martinet *et al.*, 2002; Mercer *et al.*, 2007). De plus, ajoutées aux fonctions de p53 « éliminateur de cellules endommagées » (par induction d'une apoptose et d'une sénescence), p53 peut exercer des effets protecteurs qui favorisent la survie cellulaire (réparation de l'ADN, régulation du métabolisme, propriétés anti-oxydantes); la décision entre induction d'une mort cellulaire ou d'une survie cellulaire dépendant

de la nature et de l'intensité du stress activateur de p53, du type cellulaire et tissulaire et de l'environnement cellulaire associé (Vousden *et al.*, 2009a). La balance entre activation et inactivation de p53 dans les CML-AP HTAPi pourrait donc favoriser l'induction des effets protecteurs cellulaires de p53 et ainsi participer à la survie des CML-AP HTAPi. Dans ce contexte, nous avons tenté d'examiner plusieurs voies régulées par l'activité transcriptionnelle de p53 en évaluant l'expression d'une vingtaine de ses cibles par RT-qPCR; cependant nous n'avons observé aucune différence significative du taux d'ARNm de ces cibles entre CML-AP HTAPi et contrôles.

- 5- En condition physiologique, le taux de p53 est régulé négativement et sa demi-vie est très courte. Ainsi il est particulièrement difficile de mettre en évidence une diminution du taux protéique de p53 dans les CML-AP HTAPi par rapport à des contrôles où le taux de p53 est initialement probablement déjà faible (potentiellement d'autant plus faible au vu de l'origine de ces cellules).

C'est pourquoi, nous avons évalué la réponse à des stress cellulaires connus comme inducteurs de p53 dans les CML-AP HTAPi et contrôles, en émettant l'hypothèse que la capacité d'activation de p53 pourrait alors être altérée dans les CML-AP HTAPi. Pour ce faire, nous avons testé trois activateurs de p53: l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II qui induit un stress génotoxique, l'H₂O₂ qui induit un stress oxydant et la Nutlin-3a qui inhibe la dégradation de p53 en empêchant la liaison p53-MDM2. Nous n'avons pas observé de différence significative dans la réponse à ces stress entre CML-AP HTAPi et contrôles en terme d'expression protéique de p53, ni de sa forme phosphorylée en serine 15, ni de ses cibles p21, BAX et MDM2. Cependant le stress oxydant induit par l'H₂O₂ a augmenté significativement le taux protéique de p53 (et de p21) dans les CML-AP contrôles alors que nous n'avons pas observé de différence significative dans la réponse à ce stress dans les CML-AP HTAPi, suggérant une perte de sensibilité au stress oxydant exogène dans les CML-AP HTAPi, probablement lié au statut redox modifié dans l'HTAP. Nous avons également analysé la translocation nucléaire de p53, reflet de son activation (du moins en partie), en réponse à ces stress cellulaires, par une technique visuelle d'immunofluorescence, et il semblerait qu'elle soit moins intense dans les CML-AP HTAPi que les contrôles en condition de stress oxydant, corroborant le résultat précédent.

De plus, l'analyse du séquençage du gène *TP53* réalisé chez les CML-AP HTAPi n'a pas mis en évidence de variation génétique dans les parties exoniques codants pour la liaison à l'ADN de p53 où sont retrouvées la plupart des mutations qui sont à l'origine de l'inactivation de p53 dans les cancers humains. Ainsi ce résultat pourrait suggérer que l'activité de p53 ne soit pas altérée dans les CML-AP HTAPi.

Nous nous sommes également intéressés à une autre protéine de la famille de p53: la protéine p73. Nous avons étudié deux isoformes qui présentent des propriétés opposées: la forme longue TAp73 aux propriétés similaires à p53 et la forme tronquée $\Delta Np73$ qui antagonise p53 et TAp73. Les western-blots réalisés à partir des CML-AP n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative dans l'expression protéique de TAp73 ni de $\Delta Np73$ entre HTAPi et contrôles (à l'état basal ni en condition de stress). En revanche, les marquages immuno-histochimiques réalisés sur des coupes de poumons de patients ont révélé une diminution de l'expression de l'isoforme TAp73 dans la média des AP remodelées des patients HTAPi par rapport aux AP contrôles non remodelées. Bien que ces résultats ne soient pour l'instant que des résultats préliminaires, ils pourraient refléter la perte d'altérations physiopathologiques lors de la mise en culture des CML-AP, comme cela a déjà été montré pour d'autres voies comme le PDGF (Eddahibi *et al.*, 2001; Perros *et al.*, 2008b). En outre, nous avons rencontré plusieurs difficultés techniques dans la mise au point des conditions de stress, des conditions de western-blots, de choix des anticorps (très limité en particulier pour l'isoforme $\Delta Np73$)... qui demandent d'être très prudent dans l'interprétation de ces données.

Bien que nous n'ayons pas observé de diminution du taux protéique de p53 (ni de p73) dans les CML-AP HTAPi, nous avons mis en évidence une augmentation du taux protéique du principal régulateur de p53, la protéine MDM2. Plusieurs hypothèses explicatives et perspectives d'étude peuvent être envisagées:

1. Cette surexpression de MDM2 peut être considérée comme une caractéristique « pseudo-tumorale » des CML-AP HTAPi, étant donné qu'une augmentation de l'expression de MDM2, associée à un mauvais pronostic clinique, est observée dans un bon nombre de cancers humains,

notamment en réponse à l'activation de voies oncogéniques comme les voies Ras et Erk (qui activent AP-1 et Ets conduisant à une augmentation de la transcription de MDM2) (Manfredi, 2010; Momand *et al.*, 1998). Similairement aux cancers, cette augmentation d'expression de MDM2 peut alors devenir une cible thérapeutique pertinente dans l'HTAPi.

2. L'augmentation de l'expression de MDM2 peut également être interprétée comme un élément qui régule négativement une potentielle activation excessive de p53. En effet, nous avons proposé précédemment que l'environnement pathologique de l'HTAP (inflammation chronique et dommages à l'ADN) pourrait être perçu comme activateur de p53 et que par conséquent nous soyons en présence d'une balance entre activation et inactivation de p53, aboutissant à une normalisation du taux protéique de p53. Dans cette hypothèse, l'inactivation de p53 pourrait être due à l'augmentation de MDM2 observée dans les CML-AP HTAPi. Cependant il ne faut pas négliger la boucle de rétrocontrôle qui existe entre p53 et MDM2 puisque que p53 peut induire la transcription de MDM2 (via sa fixation sur une séquence RE localisée juste devant le promoteur P2 « inductible » de MDM2). Ainsi on pourrait envisager que l'activation de p53, dans le contexte physiopathologique activateur de p53 de l'HTAP, induirait une élévation de l'expression de MDM2, qui régulerait négativement le taux protéique de p53, ce qui conduirait alors à une normalisation de p53.
3. Cependant bien que le taux d'expression protéique soit un marqueur important pour déterminer l'état d'activation de cette protéine, il n'est pas toujours corrélé à son activité enzymatique (lorsqu'il s'agit d'une enzyme par exemple); ce qui pourrait expliquer que la surexpression de MDM2 ne soit pas corrélée à une diminution de l'expression de p53. En effet, plusieurs voies décrites comme altérées dans l'HTAP pourraient avoir des conséquences sur l'activité de MDM2: par exemple, l'augmentation de la phosphorylation de la protéine AKT (Houssaini *et al.*, 2013) pourrait induire celle de MDM2 et l'augmentation de l'expression de la protéine TCTP pourrait diminuer son auto-ubiquitination (Amson *et al.*, 2012; Lavoie *et al.*, 2014). Ainsi, il serait intéressant de développer l'aspect fonctionnelle de l'activité de MDM2 dans l'HTAP afin d'étudier ses modifications post-traductionnelles, son interaction avec p53, son activité d'ubiquitine-ligase et sa compartimentation subcellulaire. Il serait également pertinent d'étudier

les interactions protéines-protéines de p53 (avec ses co-activateurs notamment) qui pourraient empêcher la fixation de MDM2 sur p53.

4. Chez les patients présentant une HTAP idiopathique ou familiale (dont le développement de l'HTAP est plus précoce en général), il serait également intéressant de rechercher l'éventuelle présence du SNP 309 dans le gène de *MDM2* qui est associée à une élévation de l'expression de MDM2 et au développement précoce de certains cancers (chez des patients plus jeunes) (Bond *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2011).
5. Une autre explication pourrait être une altération du fonctionnement du protéasome dans les CML-AP HTAPi. Ainsi il serait intéressant d'étudier le degré d'ubiquitination de p53, la compartimentation subcellulaire de la forme p53 ubiquitinylée, en condition basale et en présence d'inhibiteur du protéasome (MG132 et/ou bortezomib), qui ont en outre montré des effets bénéfiques dans l'HTAP (Ibrahim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011a).
6. Pour finir, l'implication de l'augmentation de l'expression de MDM2 dans l'HTAP pourrait être liée à l'activité oncogénique de MDM2 indépendante de p53. En effet, MDM2 peut interagir avec d'autres cibles que p53 et ainsi réguler l'expression et l'activité de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'invasion tumorale (Ganguli *et al.*, 2003). Par exemple, MDM2 peut se fixer sur pRb (et induire sa dégradation), sur E2F1 (dont l'expression est induite dans des CML-AP humaines mises en hypoxie (Yu *et al.*, 2011)) et sur son co-facteur DP-1 (et activer leur activité transcriptionnelle). MDM2 peut ainsi empêcher l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et favoriser la progression de la phase S (Loughran *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 1995; Miwa *et al.*, 2006; Sdek *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2005). De plus, en réponse à l'activation de voies oncogéniques comme les voies Ras et Erk, le facteur de transcription Foxo3a, qui module l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire comme p27 (dont l'expression est en outre diminuée dans l'HTAP (Xu *et al.*, 2010)) est phosphorylé. MDM2 peut alors induire sa dégradation par ubiquitination, ce qui représente un autre moyen de régulation du cycle cellulaire par MDM2 qui pourrait être impliqué dans la physiopathologie de l'HTAP. Par ailleurs, la surexpression de MDM2 pourrait également participer au processus de résistance à l'apoptose

décrit dans l'HTAP, via son activité sur E2F1 (Loughran *et al.*, 2000) et sa liaison à l'ARNm de XIAP, un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP), favorisant sa transcription et donc son activité anti-apoptotique par liaison avec les caspases impliquées dans l'apoptose intrinsèque (Gu *et al.*, 2009). Une autre fonction de MDM2 pourrait participer au processus de transition endothéliale-mésenchymateuse pour lequel de plus en plus de données semblent indiquer son implication dans la physiopathologie de l'HTAP (Arciniegas *et al.*, 2007; Sakao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2006). En effet, MDM2 a la capacité d'interagir avec la E-cadhérine et de favoriser sa dégradation par ubiquitination, participant ainsi au processus de motilité cellulaire, d'invasion tumorale et donc au développement de métastases (Yang *et al.*, 2006). La surexpression de MDM2 pourrait donc participer à l'inactivation de la E-cadhérine, en association avec la protéine TWIST dont l'expression est augmentée dans les poumons de patients HTAP (Ranchoux, publication à paraître) et ainsi favoriser le processus de transition endothéliale-mésenchymateuse dans l'HTAP.

L'augmentation de l'expression de MDM2 observée dans les CML-AP HTAPi pourrait également représenter un élément déterminant du mécanisme d'action de la Nutlin-3a dont on a vu que l'activité anti-proliférative était particulièrement accrue dans les CML-AP HTAPi (associée à une augmentation significative de la protéine pro-apoptotique BAX). En effet, l'équipe de Mouraret *et al.*, qui ont démontré le potentiel thérapeutique de la Nutlin-3a dans plusieurs modèles expérimentaux d'HTAP chez la souris, a suggéré que la potentialisation de l'effet de la Nutlin-3a pourrait être due à la surexpression de MDM2 (Mouraret *et al.*, 2013). De plus, au vu des données rapportées dans différents types de cellules tumorales, on pourrait envisager que le mécanisme sous jacent soit lié à l'activité de MDM2 sur p53 bien sur, mais également sur la voie pRb/E2F1 (Kitagawa *et al.*, 2008a). Dans le cancer du poumon, une étude a par exemple proposé que le mécanisme de la Nutlin-3a pourrait faire intervenir des processus épigénétiques (diminution de la méthylation de l'ADN au niveau de certains gènes suppresseurs de tumeurs) via la régulation de l'expression de méthyltransférases (en l'occurrence DNMT3A) par l'intermédiaire de la régulation de la voie Rb/E2F (Tang *et al.*, 2012). Ainsi en perspectives des résultats prometteurs de la Nutlin-3a observés sur les

CML-AP HTAPi dans notre étude, il serait intéressant de détailler le mécanisme d'action de la Nutlin3a en vue d'une éventuelle application clinique (Fukumoto *et al.*, 2013), en étudiant son effet sur l'apoptose, le cycle cellulaire, les processus épigénétiques et les protéines Rb et E2F1.

En lien direct avec cette dernière partie de mon projet de thèse, j'ai suivi un « Diplôme Universitaire de Formation à la Recherche Clinique » à la faculté de médecine de Montpellier au cours duquel il nous a été demandé d'inventer un projet d'étude clinique. Dans ce cadre, j'ai envisagé de tester l'application clinique de la Nutlin-3a au cours d'une étude de phase 2, preuve de concept, avec le RO5045337, une molécule de la famille des Nutlins chimiquement optimisée pour son application clinique. Vous trouverez en annexes le synopsis de cette étude surnommée PROTEK pour « Pulmonary hypertension evaluation of RO5045337: Tolerance, Efficacy and Kinetics ».

Annexes

Diplôme Universitaire 2014 Faculté de Médecine de Montpellier
« Formation à la Recherche Clinique »

Projet d'étude clinique
Sophie Jacquin

ETUDE PROTEK

Titre complet de l'étude:

*Evaluation de l'efficacité, de la tolérance et de la
pharmacocinétique du RO5045337 chez des patients atteints
d'hypertension artérielle pulmonaire*

Synopsis de l'étude « PROTEK »

Titre complet de la recherche	Evaluation de l'efficacité, de la tolérance et de la pharmacocinétique du RO5045337 chez des patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire: Etude « PROTEK »
Promoteur	Industriel (Hoffmann-la-Roche)
Coordonnateur de l'étude	Pr S., Chef de service de pneumologie de l'Hôpital Bicêtre « Centre national de référence pour l'HTAP sévère » Service de pneumologie du CHU de Bicêtre 78 rue de la division du général Leclerc 94 270 Le Kremlin-Bicêtre Tel: 01 45 21 79 79 Fax: 01 45 21 79 71
Centres et investigateurs associés	7 centres associés spécialisés dans la prise en charge de l'HTAP: <ul style="list-style-type: none"> - France: Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris), Hôpital Louis Pradel (Lyon), Hôpital de Brabois (Nancy) - Allemagne: Universitätsklinikum Gießen und Marburg (Gießen) - USA: Massachusetts General Hospital (Boston), Medstar Washington Hospital Center (Washington) - Angleterre: Hammersmith Hospital (London)
Justification et Pertinence de la recherche	<p><u>Justification et analyse critique de la pertinence de la recherche:</u></p> <p>L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare mais grave puisqu'elle peut conduire à une insuffisance cardiaque droite et au décès du patient. Elle se caractérise par une augmentation progressive des pressions artérielles pulmonaires (PAPm supérieures ou égales à 25mmHg) et pour laquelle le principal symptôme est l'essoufflement à l'effort. D'un point de vue physiopathologique, l'HTAP est la conséquence d'un intense « remodelage vasculaire » affectant particulièrement les petites artères pulmonaires, incluant entre autres une vasoconstriction, une muscularisation, une inflammation chronique et des anomalies morphologiques, oblitérant progressivement la lumière de ces vaisseaux. Des caractéristiques communes entre cancer et HTAP ont été observées ces dernières années dont une prolifération cellulaire incontrôlée et une résistance à l'apoptose. Ainsi l'utilisation de médicaments anticancéreux, dont certains sont d'ores et déjà à l'étude, pourrait être bénéfique dans le traitement de l'HTAP, pour laquelle la seule option curative est la transplantation pulmonaire.</p> <p>Par conséquent, il est proposé ici de tester le RO5045337, initialement développé en tant qu'anticancéreux (Vassilev, 2007), dans le traitement de l'HTAP pour cibler l'hyperprolifération de cellules constituant la paroi des petites artères pulmonaires remodelées. En effet, le RO5045337 est un inhibiteur de la liaison p53-MDM2 de la famille des Nutlins, qui stabilise la protéine p53 et ainsi favorise ses activités antiprolifératives. C'est le premier composé appelé « inhibiteur de MDM2 » à avoir été testé en clinique et qui est en cours d'études cliniques de phases 1 et 2 dans le cancer (Ray-Coquard <i>et al.</i>, 2012). En stabilisant et activant p53, il a récemment montré des effets antiprolifératifs prometteurs sur des modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> expérimentaux d'HTAP (Fukumoto <i>et al.</i>, 2013; Mouraret <i>et al.</i>, 2013) ainsi que sur des cellules de patients HTAP (données non encore publiées) qui justifient de le tester maintenant chez des patients HTAP.</p>
Objectifs	<p><u>Objectif principal:</u> évaluation de l'efficacité du RO5045337 sur la capacité d'exercice de patients atteints d'HTAP.</p> <p><u>Objectif secondaire:</u> évaluation de la pharmacocinétique et de la tolérance du RO5045337 chez des patients HTAP.</p>

Type d'étude	<p><u>Design de l'étude:</u> Interventionnelle: essai thérapeutique, médicament, étude de preuve de concept de phase 2 Comparative Prospective Multicentrique, internationale (un comité de pilotage est prévu pour veiller au bon déroulement opérationnel de l'étude) Contrôlée Randomisée Double aveugle Contre placebo Deux bras parallèles.</p>
Population	<p><u>Population ciblée:</u> Patients HTAP de classe fonctionnelle NYHA II à IV (modérée à sévère), avec ou sans traitement concomitant pour leur HTAP. <u>Critères d'inclusion:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Sexe indifférent - Affiliation à un régime de sécurité sociale - Consentement éclairé et écrit des patients ou des représentants légaux - HTAP pré-capillaire diagnostiquée par un KT droit (PAPm \geq 25mmHg), d'origine idiopathique, familiale, ou associée à des connectivites, à une maladie cardiaque congénitale ou à la prise d'anorexigènes. - Classe fonctionnelle NYHA II à IV - Stables selon les critères suivants: <ul style="list-style-type: none"> o Absence de modification thérapeutique de l'HTAP depuis au moins 3 mois o Cliniquement stables depuis au moins 1 mois: sans signe de décompensation cardiaque droite (majoration de la dyspnée et de la classe fonctionnelle NYHA, apparition de douleur thoracique, malaise), sans signe de souffrance viscérale associée apparaissant ou s'aggravant (pas d'apparition ou de majoration des œdèmes des membres inférieurs, de turgescence jugulaire, de reflux hépato-jugulaire, d'hépatomégalie, d'insuffisance hépatique ou rénale) o Test de marche comparable sur les 3 derniers mois avant l'inclusion. <p><u>Critères de non inclusion:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Femmes enceintes ou allaitantes - Patients incapables de suivre le protocole incluant l'évaluation des critères de jugements ou absence de consentement - Patients participant à une autre étude de recherche clinique - Patients HTAP de classe fonctionnelle NYHA I - Patients cliniquement instables avec leur traitement habituel - Patients atteints du SIDA - Troubles de la coagulation, thrombocytopenie, immunodéficience, insuffisance rénale et/ou hépatique sévère: en cours ou passés.
Critères de jugement	<p><u>Critère de jugement principal:</u> différence de la distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes entre la première visite (avant l'instauration du traitement) et au bout des 3 mois de traitement. Ce test qui mesure la distance que le patient peut marcher sur une période de 6 minutes est le critère de jugement le plus souvent utilisé dans les études cliniques évaluant l'efficacité de médicaments dans l'HTAP. Sa mesure est simple, sûre, peu coûteuse, aisément réalisable (en particulier dans les centres investigateurs sélectionnés spécialisés dans l'HTAP) et corrélée à</p>

	<p>l'oxygénation du patient (Fleg <i>et al.</i>, 2000). Concernant la méthodologie de ce test, il sera demandé aux centres investigateurs de respecter les recommandations de l'American Thoracic Society (ATS) (cf. Guidelines (2002)). En pratique, l'ATS recommande de réaliser ce test dans un couloir de 30 mètres, couvert, plat, rectiligne, bien délimité et non fréquenté. Il doit être marqué tous les 3 mètres. Deux cônes marquent l'endroit des demi-tours. Une bande de couleur est souhaitée pour marquer la ligne de départ.</p> <p><u>Critères de jugement secondaires:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Etude de la pharmacocinétique du RO5045337 par dosages sanguins. - Etude de la tolérance par relevé des effets indésirables et de l'interruption ou de l'arrêt du traitement testé. - Etude des paramètres biochimiques sanguins: Gaz du sang, NFS, fonctions rénale et hépatique. - Evolution de la distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes à chaque visite par rapport à la visite d'inclusion. - Evolution des paramètres hémodynamiques importants dans l'HTAP: PAPm, RVP, débit cardiaque, index cardiaque, pression oreillette droite (par un cathétérisme droit). - Evolution du degré de dyspnée évaluée par la classification fonctionnelle NYHA (cf. Annexe: Méthode d'évaluation de la classification fonctionnelle NYHA adaptée à l'HTAP). - Evolution du bio-marqueur NT-proBNP (un marqueur biologique de la sévérité de l'HTAP).
<p>Taille de l'échantillon</p>	<p><u>Critères pour le calcul du NSN:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Ratio de randomisation 2 : 1 (RO5045337 <i>versus</i> placebo). - Pour le critère de jugement principal, nous espérons une amélioration du test de marche de 6 minutes de 50 mètres avec le RO5045337. - Le test statistique réalisé pour analyser le critère de jugement principal sera un test apparié de Wilcoxon. Le résultat sera considéré statistiquement différent quand $p < 0.05$. - Risques d'erreur consentis: <ul style="list-style-type: none"> • Risque α: 5% • Risque β: 10% (Puissance: 90%) - Analyses en sous-groupes prévues.
<p>Population d'analyse et plan d'analyse statistique</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Le <u>critère de jugement principal</u> qui est la différence de distance parcourue lors du test de marche de 6 minutes entre la visite d'inclusion et la fin du traitement (variable quantitative appariée) sera analysé en intention de traiter. Les données manquantes seront imputées de la pire des valeurs (0 mètre) en cas de non mesure lors de la dernière visite, d'aggravation clinique sans visite de fin d'étude ou de mort du patient. L'analyse statistique du critère de jugement principal sera réalisée par un test de rangs de Wilcoxon. - Les <u>critères de jugement secondaires</u> seront analysés en per protocole. La pharmacocinétique sera analysée de manière descriptive: AUC_{0-24h} (mesure effectuée lors du 1^{er} jour de traitement). La sécurité d'emploi du produit sera également analysée de manière descriptive: nombre et fréquence des différents EI et EIG pendant le traitement et la période de suivi et des interruptions et arrêts de traitement éventuels. Les résultats biologiques (Gaz du sang, NFS, fonctions rénale et hépatique) seront suivis de manière descriptive au cours du traitement et pendant la période de suivi et analysés par un test de rangs de Wilcoxon (différence entre la valeur mesurée à chaque visite et la valeur mesurée avant l'instauration du traitement). La différence des paramètres hémodynamiques entre la visite d'inclusion et la fin du traitement (PAPm, RVP, débit cardiaque, index cardiaque, pression oreillette droite) (variables

	<p>quantitatives appariées) sera analysée par un test de rangs de Wilcoxon. La différence du degré de dyspnée évaluée par la classe fonctionnelle NYHA entre la visite d'inclusion et la fin du traitement (variable qualitative appariée) sera analysée par un test apparié de Mac Nemar. La différence des taux plasmatiques de NT-proBNP et des distances parcourues lors du test de marche de 6 minutes entre la mesure effectuée à chaque visite et la mesure effectuée avant l'instauration du traitement (variables quantitatives appariées) sera analysée par un test de rangs de Wilcoxon.</p> <p>- Une <u>analyse en sous-groupes</u> est prévue pour les patients de la classe fonctionnelle NYHA IV, pour les différentes classes de traitements associés (inhibiteurs de PDE5, antagonistes de l'endothéline, analogues de prostacyclines) et pour le groupe traité par le RO5045337 en monothérapie.</p>
Durée de l'étude	<p>Période de recrutement: 12 mois Durée de traitement par patient: 3 mois Durée de suivi par patient: 3 mois Durée totale (incluant analyse et rédaction rapport): 24 mois</p>
Déroulement de l'étude	<p>Les patients seront vus au cours d'une visite de suivi classique pour leur pathologie et l'étude leur sera présentée puis proposée.</p> <p>Dans le cas d'un accord des patients pour participer à l'étude, leur <u>consentement</u> éclairé et écrit seront recueilli et les patients seront programmés pour leur visite d'inclusion correspondant à la visite V1.</p> <p>Les patients sont alors <u>randomisés</u> (ratio 2 : 1) dans l'un des 2 bras (RO5045337 : placebo). La randomisation sera centralisée et se fera via un système informatisé indépendant.</p> <p><u>Visite d'inclusion V1</u>: 48 heures en hospitalisation</p> <p>Les examens suivants seront réalisés pour déterminer l'état de base des patients et permettre leur suivi:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Test de marche de 6 minutes - Cathétérisme droit - Echographie cardiaque - Prélèvements sanguins: NT-proBNP, Gaz du sang, NFS, fonctions rénale et hépatique - Evaluation de la classe fonctionnelle NYHA. <p>Les patients recevront alors le produit testé ou le placebo, qui se présenteront sous la même forme galénique (comprimé). La posologie du RO5045337 sera de 100 mg/jour et le schéma de prise pour le RO5045337 et le placebo sera le suivant: une prise par jour, tous les jours. Les patients recevront l'équivalent de un mois de traitement.</p> <p>Afin d'évaluer la pharmacocinétique du produit chez les patients HTAP, le produit sera dosé dans le sang des patients lors de la première prise (analyse réalisée par un laboratoire indépendant qui ne communiquera pas les résultats des dosages avant la levée d'aveugle) à 0h, 1h, 2h, 3h, 5h, 8h et 24h pour calculer une AUC_{0-24h}.</p> <p><u>Visite V2</u>: hôpital de jour, au 8^{ème} jour de traitement</p> <p>Le produit sera dosé dans le sang des patients après la 8^{ème} prise du produit (pic d'exposition observé dans des études préliminaires).</p> <p>Il sera également réalisé un test de marche de 6 minutes et des prélèvements sanguins pour évaluer: le NT-proBNP, les gaz du sang, la NFS, les fonctions rénale et hépatique.</p> <p>Il faudra également s'assurer que les patients suivent bien leur traitement et de l'absence d'EI ou EIG.</p> <p><u>Visites V3 et V4</u>: hôpital de jour, à la fin des 1^{er} et 2^{ème} mois de traitement.</p> <p>La concentration sanguine du produit sera dosée à chaque visite.</p>

	<p>Il sera également réalisé un test de marche de 6 minutes et des prélèvements sanguins pour évaluer: le NT-proBNP, les gaz du sang, la NFS, les fonctions rénale et hépatique.</p> <p>Il faudra également s'assurer de l'observance des patients pour leur traitement et relever les EI et EIG s'il y a lieu.</p> <p>L'équivalent d'un mois de traitement sera délivré aux patients à chaque visite.</p> <p><u>Visite de fin d'étude V5</u>: hôpital de jour, à la fin du 3^{ème} mois de traitement.</p> <p>Les examens suivant seront réalisés pour déterminer l'état des patients à la fin de l'étude:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Test de marche de 6 minutes - Cathétérisme droit - Echographie cardiaque - Prélèvements sanguins: NT-proBNP, Gaz du sang, NFS, fonctions rénale et hépatique - Evaluation de la classe fonctionnelle NYHA. <p>La concentration sanguine du produit sera dosée.</p> <p>Les éventuelles unités thérapeutiques non prises par les patients devront être rapportées par les patients, comptabilisées et renvoyées à la pharmacie.</p> <p><u>Visites de suivi V6 et V7</u>: à 1 mois et 3 mois après l'arrêt du traitement, les patients seront revus en hospitalisation de jour pour une nouvelle échographie cardiaque, des prélèvements sanguins de contrôle (Gaz du sang, NFS, fonctions rénale et hépatique) et le relevé des éventuels EI ou EIG.</p> <p>Une fiche de fin d'étude sera remplie pour chaque patient.</p>
Bénéfices/Risques	<p><u>Bénéfices attendus</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bénéfices individuels: cette étude offre aux patients la possibilité d'être traités par une nouvelle molécule active, proposée ici au vu des caractéristiques physiopathologiques pseudo-tumorales de l'HTAP décrites ces dernières années. Si le traitement s'avère efficace, les patients pourront ainsi bénéficier d'une amélioration de leurs symptômes et de leur qualité de vie. Les patients participant à l'étude bénéficieront également d'un suivi rapproché pendant les 3 mois de l'étude. - Bénéfices collectifs: la molécule testée cible une voie originale à visée anti-proliférative, potentiellement complémentaire par rapport aux traitements existants de l'HTAP à visée vasodilatatrice (inhibiteurs de PDE5, antagonistes de l'endothéline, analogues de prostacyclines). Ainsi si la molécule s'avère efficace, elle constituera une nouvelle option thérapeutique et pourra être proposée aux malades en monothérapie ou en thérapie combinée (puisque la molécule sera donnée en complément du traitement habituel et qu'une analyse statistique en sous-groupes par rapport aux différents traitements concomitants est prévue). Dès lors, cette molécule pourrait permettre de diminuer le nombre de patients en stades sévères et/ou nécessitant une transplantation pulmonaire et d'améliorer la survie des patients atteints d'HTAP qui pour l'heure reste faible. Par ailleurs, l'étude de cette molécule dans l'HTAP permettra d'améliorer les connaissances physiopathologiques de la maladie. <p><u>Risques prévisibles</u>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Risques liés à la molécule testée: <ul style="list-style-type: none"> o Effets indésirables non graves: nausée, vomissements, diarrhée (relevés chez plus de 20% des patients lors d'une étude clinique de phase 1). o Effets indésirables graves: thrombocytopénie et neutropénie. C'est pourquoi un suivi du taux des plaquettes et des leucocytes (NFS) est prévu à chaque visite. - Risques liés aux contraintes de l'étude et aux examens complémentaires réalisés au cours de l'étude:

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Les patients étant suivis classiquement en consultation ou en hôpital de jour tous les 2 à 3 mois pour leur HTAP, la participation à cette étude implique des visites plus fréquentes (8^{ème} jour, puis 1 visite par mois pendant 4 mois et 1 visite de suivi 2 mois après) et de plus longue durée pour la visite d'inclusion (48h en hospitalisation). Afin de minimiser le risque des perdus de vue, seuls les patients pouvant respecter ce schéma d'étude ne seront inclus dans l'étude. ○ Au cours de ces visites, 5 tests de marche, 7 bilans biologiques, 4 échographies cardiaques, 1 cinétique de prélèvement sanguin sur 24h et 2 cathétérismes cardiaques droits seront prévus par patient. Outre le risque des prélèvements sanguins, le cathétérisme cardiaque droit présente potentiellement des risques puisqu'il s'agit d'un examen invasif, réalisé sous anesthésie locale. Cependant cet examen fait parti du suivi classique des patients HTAP et est recommandé 3 mois après chaque modification de traitement.
Moyens nécessaires à la réalisation de l'étude	<p><u>Postes de dépenses:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Frais généraux: frais de promotion (préparation du dossier, rédaction du protocole, mise en place de l'essai, frais de randomisation, dépôt du dossier aux agences réglementaires, assurance, monitoring de suivi au cours de l'étude et frais de clôture) frais de gestion de la base de données (développement, maintenance, suivi et archivage du cahier d'observation électronique), indemnisation des patients, réunions du comité de pilotage, communication et congrès, déplacements. - Dépenses de personnel: chef de projet coordinateur, médecins investigateurs, ARC investigateurs, ARC moniteurs, infirmiers, pharmaciens, méthodologiste/statisticien, chargé de pharmacovigilance. - Dépenses médicales: actes médicaux (par patient: 5 tests de marche, 7 bilans biologiques, 4 échographies cardiaques, 1 cinétique de prélèvement sanguin sur 24h avec dosage du RO5045337, 4 dosages séquentiels du RO5045337, 5 dosages des NT-proBNP, 2 cathétérismes cardiaques droits, 1 hospitalisation de 48h, 6 hospitalisations de jour), frais liés à la gestion des éventuels EI et EIG, prestation pharmacie, prestation laboratoire indépendant de dosage du RO5045337. <p><u>Budget total:</u> environ 500 000 euros</p>
Aspects réglementaires et éthiques	<p>Le protocole de l'étude sera soumis à l'approbation des comités d'éthiques indépendants et des autorités compétentes dont dépend chaque centre investigateur.</p> <p>Le consentement libre et éclairé de tous les participants ou de leurs représentants légaux sera recueilli après information par le médecin investigateur. Un exemplaire de ce consentement avec une note d'information sur l'étude sera remis à chaque participant. Un exemplaire du consentement de chaque participant sera conservé par l'investigateur et le promoteur.</p> <p>En outre, l'étude sera conduite selon les principes internationaux de la déclaration d'Helsinki et selon les principes de bonnes pratiques cliniques en vigueur.</p>

Références bibliographiques:

(2002). ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American journal of respiratory and critical care medicine* **166**(1): 111-117.

Fleg JL, Pina IL, Balady GJ, Chaitman BR, Fletcher B, Lavie C, *et al.* (2000). Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* **102**(13): 1591-1597.

Fukumoto J, Lockey R, Kolliputi N (2013). New hope for Nutlin-3a therapy for pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in pharmacology* **4**: 87.

Mouraret N, Marcos E, Abid S, Gary-Bobo G, Saker M, Houssaini A, *et al.* (2013). Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation* **127**(16): 1664-1676.

Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, *et al.* (2012). Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *The lancet oncology* **13**(11): 1133-1140.

Vassilev LT (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in molecular medicine* **13**(1): 23-31.

Annexe: Méthode d'évaluation de la classe fonctionnelle NYHA adaptée à l'HTAP.

Classe fonctionnelle	Description
Classe 1	HTAP sans limitation de l'activité physique. Une activité physique ordinaire ne cause pas de dyspnée, de fatigue, de douleur thoracique excessive, ni de syncope.
Classe 2	HTAP avec une légère limitation de l'activité physique. Le patient est à l'aise au repos mais une activité physique ordinaire cause une dyspnée, une fatigue et une douleur thoracique excessive, voire même une syncope.
Classe 3	HTAP avec une limitation marquée de l'activité physique. Le patient est à l'aise au repos mais la moindre activité physique cause une dyspnée, une fatigue, une douleur thoracique excessive, ou une syncope.
Classe 4	HTAP avec une incapacité de réaliser une quelconque activité physique sans symptômes. Le patient présente des signes d'insuffisance cardiaque droite. La dyspnée et la fatigue peuvent être présentes au repos et l'inconfort augmente à la moindre activité physique.

Références bibliographiques

(2002). ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American journal of respiratory and critical care medicine* 166(1): 111-117.

Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, *et al.* (2004). Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circulation research* 94(3): 385-393.

Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, *et al.* (2006). Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* 48(6): 280-285.

Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, *et al.* (2010). Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 121(25): 2747-2754.

Abid S, Houssaini A, Mouraret N, Marcos E, Amsellem V, Wan F, *et al.* (2014). P21-dependent protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule-3 in pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34(2): 304-312.

Achcar RO, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF, *et al.* (2006). Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension. *Chest* 129(3): 696-705.

Adimoolam S, Ford JM (2002). p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(20): 12985-12990.

Adnot S (2005). Lessons learned from cancer may help in the treatment of pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 115(6): 1461-1463.

Adnot S, Eddahibi S (2007). Lessons from oncology to understand and treat pulmonary hypertension. *International journal of clinical practice. Supplement*(158): 19-25.

Alarcon R, Koumenis C, Geyer RK, Maki CG, Giaccia AJ (1999). Hypoxia induces p53 accumulation through MDM2 down-regulation and inhibition of E6-mediated degradation. *Cancer research* 59(24): 6046-6051.

Alastalo TP, Li M, Perez Vde J, Pham D, Sawada H, Wang JK, *et al.* (2011). Disruption of PPARgamma/beta-catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *The Journal of clinical investigation* 121(9): 3735-3746.

- Aldred MA, Comhair SA, Varella-Garcia M, Asosingh K, Xu W, Noon GP, *et al.* (2010). Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182(9): 1153-1160.
- Amabile N, Guignabert C, Montani D, Yeghiazarians Y, Boulanger CM, Humbert M (2013). Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 42(1): 272-279.
- Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, *et al.* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circulation research* 92(10): 1162-1169.
- Amson R, Pece S, Lespagnol A, Vyas R, Mazzarol G, Tosoni D, *et al.* (2012). Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nature medicine* 18(1): 91-99.
- Antoni L, Sodha N, Collins I, Garrett MD (2007). CHK2 kinase: cancer susceptibility and cancer therapy - two sides of the same coin? *Nature reviews. Cancer* 7(12): 925-936.
- Antoniou SA (2012). Targeting RhoA/ROCK pathway in pulmonary arterial hypertension. *Expert opinion on therapeutic targets* 16(4): 355-363.
- Archer SL (2013). Riociguat for pulmonary hypertension--a glass half full. *The New England journal of medicine* 369(4): 386-388.
- Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK (2008). Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O2-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294(2): H570-578.
- Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, *et al.* (2010a). Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 121(24): 2661-2671.
- Archer SL, Weir EK, Wilkins MR (2010b). Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 121(18): 2045-2066.
- Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR (2007). Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293(1): L1-8.
- Artandi SE, DePinho RA (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31(1): 9-18.
- Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, *et al.* (2002). Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105(14): 1672-1678.

- Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, *et al.* (2012). Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circulation. Cardiovascular genetics* 5(3): 336-343.
- Austin ED, Rock MT, Mosse CA, Vnencak-Jones CL, Yoder SM, Robbins IM, *et al.* (2010). T lymphocyte subset abnormalities in the blood and lung in pulmonary arterial hypertension. *Respiratory medicine* 104(3): 454-462.
- Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, *et al.* (2000). Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Annals of internal medicine* 132(6): 425-434.
- Bai Y, Sun L, Hu S, Wei Y (2011). Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Cardiology* 120(3): 157-165.
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922): 499-506.
- Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, *et al.* (2008). Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177(5): 536-543.
- Balabanian K, Foussat A, Dorfmuller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, *et al.* (2002). CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(10): 1419-1425.
- Barman SA, Zhu S, White RE (2009). RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vascular health and risk management* 5: 663-671.
- Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, *et al.* (1996). A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 334(5): 296-301.
- Baruteau AE, Serraf A, Levy M, Petit J, Bonnet D, Jais X, *et al.* (2012). Potts shunt in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: long-term results. *The Annals of thoracic surgery* 94(3): 817-824.
- Batchelor E, Loewer A, Mock C, Lahav G (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Molecular systems biology* 7: 488.
- Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, *et al.* (1999). Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286(5449): 2528-2531.

- Ben-Yehuda O, Pizzuti D, Brown A, Littman M, Gillies H, Henig N, *et al.* (2012). Long-term hepatic safety of ambrisentan in patients with pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 60(1): 80-81.
- Benisty JI, Folkman J, Zurakowski D, Louis G, Rich S, Langleben D, *et al.* (2005). Matrix metalloproteinases in the urine of patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 128(6 Suppl): 572S.
- Benkirane M, Sardet C, Coux O (2010). Lessons from interconnected ubiquitylation and acetylation of p53: think metastable networks. *Biochemical Society transactions* 38(Pt 1): 98-103.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, *et al.* (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126(1): 107-120.
- Benza RL, Miller DP, Barst RJ, Badesch DB, Frost AE, McGoon MD (2012). An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry. *Chest* 142(2): 448-456.
- Bergeaud M, Mathieu L, Guillaume A, Moll UM, Mignotte B, Le Floch N, *et al.* (2013). Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F(1)F0-ATP synthase. *Cell Cycle* 12(17): 2781-2793.
- Berger G, Azzam ZS, Hoffman R, Yigla M (2009). Coagulation and anticoagulation in pulmonary arterial hypertension. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 11(6): 376-379.
- Bernal F, Tyler AF, Korsmeyer SJ, Walensky LD, Verdine GL (2007). Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *Journal of the American Chemical Society* 129(9): 2456-2457.
- Bernard X, Robinson P, Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, *et al.* (2011). Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. *PLoS one* 6(10): e25981.
- Bertrand FE, McCubrey JA, Angus CW, Nutter JM, Sigounas G (2014). NOTCH and PTEN in prostate cancer. *Advances in biological regulation*.
- Bhamra-Ariza P, Keogh AM, Muller DW (2014). Percutaneous interventional therapies for the treatment of patients with severe pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 63(7): 611-618.
- Bhargava A, Kumar A, Yuan N, Gewitz MH, Mathew R (1999). Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs. *Heart Dis* 1(3): 126-132.

- Biderman L, Poyurovsky MV, Assia Y, Manley JL, Prives C (2012). MdmX is required for p53 interaction with and full induction of the Mdm2 promoter after cellular stress. *Molecular and cellular biology* 32(7): 1214-1225.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, *et al.* (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274(5286): 373-376.
- Bista M, Smithson D, Pecak A, Salinas G, Pustelny K, Min J, *et al.* (2012). On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53. *PLoS one* 7(6): e37518.
- Bjornsson J, Edwards WD (1985). Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clinic proceedings* 60(1): 16-25.
- Bock FJ, Peintner L, Tanzer M, Manzl C, Villunger A (2012). P53-induced protein with a death domain (PIDD): master of puppets? *Oncogene* 31(45): 4733-4739.
- Bockmeyer CL, Maegel L, Janciauskiene S, Rische J, Lehmann U, Maus UA, *et al.* (2012). Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and microRNA expression. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 31(7): 764-772.
- Boeckler FM, Joerger AC, Jaggi G, Rutherford TJ, Veprintsev DB, Fersht AR (2008). Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30): 10360-10365.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, *et al.* (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119(5): 591-602.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Haromy A, *et al.* (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 113(22): 2630-2641.
- Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, *et al.* (2007). The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27): 11418-11423.
- Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Leroy JP, Piette JC, *et al.* (1998). The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *The Journal of clinical investigation* 101(10): 2029-2035.
- Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, *et al.* (2007). Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nature genetics* 39(6): 776-780.

- Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tuder RM, Hopken MW, Flores SC, *et al.* (2004). Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 169(6): 764-769.
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, *et al.* (2005). Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19(10): 1751-1759.
- Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, *et al.* (2009). Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circulation research* 104(10): 1184-1191.
- Brooks CL, Li M, Gu W (2007). Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *The Journal of biological chemistry* 282(31): 22804-22815.
- Bullrich F, Rasio D, Kitada S, Starostik P, Kipps T, Keating M, *et al.* (1999). ATM mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research* 59(1): 24-27.
- Busch M, Schwindt H, Brandt A, Beier M, Gorltd N, Romaniuk P, *et al.* (2014). Classification of a frameshift/extended and a stop mutation in WT1 as gain-of-function mutations that activate cell cycle genes and promote Wilms tumour cell proliferation. *Human molecular genetics*.
- Bykov VJ, Issaeva N, Shilov A, Hulcrantz M, Pugacheva E, Chumakov P, *et al.* (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature medicine* 8(3): 282-288.
- Caruso P, Dempsie Y, Stevens HC, McDonald RA, Long L, Lu R, *et al.* (2012). A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples. *Circulation research* 111(3): 290-300.
- Caruso P, MacLean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southgate M, *et al.* (2010). Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30(4): 716-723.
- Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD (1996). IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *The Journal of clinical investigation* 97(1): 111-119.
- Chada S, Mhashilkar A, Roth JA, Gabrilovich D (2003). Development of vaccines against self-antigens: the p53 paradigm. *Current opinion in drug discovery & development* 6(2): 169-173.
- Chang YS, Graves B, Guerlavais V, Tovar C, Packman K, To KH, *et al.* (2013). Stapled alpha-helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer

therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(36): E3445-3454.

Channick RN (2013). Combination therapy in pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology* 111(8 Suppl): 16C-20C.

Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, *et al.* (2001). Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358(9288): 1119-1123.

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

Chaouat A, Weitzenblum E, Higenbottam T (1996). The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 9(2): 356-363.

Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS (2012). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 40(3): 766-782.

Chen C, Sun X, Guo P, Dong XY, Sethi P, Zhou W, *et al.* (2007a). Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene* 26(16): 2386-2394.

Chen C, Zhou Z, Ross JS, Zhou W, Dong JT (2007b). The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 121(1): 80-87.

Chen J, Guo K, Kastan MB (2012). Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA. *The Journal of biological chemistry* 287(20): 16467-16476.

Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & development* 10(19): 2438-2451.

Chene P (1998). In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *Journal of molecular biology* 281(2): 205-209.

Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS (2009). Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in cancer biology* 19(4): 218-228.

Chiappori AA, Soliman H, Janssen WE, Antonia SJ, Gabrilovich DI (2010). INGN-225: a dendritic cell-based p53 vaccine (Ad.p53-DC) in small cell lung cancer: observed association between immune response and enhanced chemotherapy effect. *Expert opinion on biological therapy* 10(6): 983-991.

Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* 255(5043): 459-462.

Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, *et al.* (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303(5660): 1010-1014.

Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, Testoni C, Mallone R, Gabrielli A, *et al.* (2002). Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 46(6): 1602-1613.

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, *et al.* (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 327(2): 70-75.

Coeytaux RR, Schmit KM, Kraft B, Kosinski AS, Mingo AM, Vann LM, *et al.* (2013). Comparative Effectiveness and Safety of Drug Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*.

Contractor T, Harris CR (2012). p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer research* 72(2): 560-567.

Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, *et al.* (1999). Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *The American journal of pathology* 155(2): 411-419.

Corcoran CA, Huang Y, Sheikh MS (2006). The regulation of energy generating metabolic pathways by p53. *Cancer biology & therapy* 5(12): 1610-1613.

Cottrill KA, Chan SY (2013). Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: the expanding relevance of the Warburg effect. *European journal of clinical investigation* 43(8): 855-865.

Courboulin A, Barrier M, Perreault T, Bonnet P, Tremblay VL, Paulin R, *et al.* (2012). Plumbagin reverses proliferation and resistance to apoptosis in experimental PAH. *The European respiratory journal* 40(3): 618-629.

Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, *et al.* (2011a). Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *The Journal of experimental medicine* 208(3): 535-548.

Courboulin A, Tremblay VL, Barrier M, Meloche J, Jacob MH, Chapolard M, *et al.* (2011b). Kruppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respiratory research* 12: 128.

- Coutts AS, La Thangue NB (2005). The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochemical and biophysical research communications* 331(3): 778-785.
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(1): 41-45.
- Cross B, Chen L, Cheng Q, Li B, Yuan ZM, Chen J (2011). Inhibition of p53 DNA binding function by the MDM2 protein acidic domain. *The Journal of biological chemistry* 286(18): 16018-16029.
- Crossno JT, Jr., Garat CV, Reusch JE, Morris KG, Dempsey EC, McMurtry IF, *et al.* (2007). Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 292(4): L885-897.
- Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, *et al.* (2009). Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* 54(3): 668-675.
- Culmsee C, Zhu X, Yu QS, Chan SL, Camandola S, Guo Z, *et al.* (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *Journal of neurochemistry* 77(1): 220-228.
- Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, Masojc B, Mierzejewski M, Debniak T, *et al.* (2004). CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *American journal of human genetics* 75(6): 1131-1135.
- Dai C, Gu W (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends in molecular medicine* 16(11): 528-536.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265(5178): 1582-1584.
- Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, *et al.* (2004). Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Molecular and cellular biology* 24(13): 5835-5843.
- Darnell JE, Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277(5332): 1630-1635.
- Dartevelle P, Fadel E, Mussot S, Chapelier A, Herve P, de Perrot M, *et al.* (2004). Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 23(4): 637-648.
- Das S, Raj L, Zhao B, Kimura Y, Bernstein A, Aaronson SA, *et al.* (2007). Hzf Determines cell survival upon genotoxic stress by modulating p53 transactivation. *Cell* 130(4): 624-637.
- Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, *et al.* (2002). ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(3): 398-405.

Davie NJ, Crossno JT, Jr., Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, *et al.* (2004). Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286(4): L668-678.

Davies RJ, Morrell NW (2008). Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest* 134(6): 1271-1277.

De Caestecker M, Meyrick B (2001). Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. *Respiratory research* 2(4): 193-197.

de Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruitter G, Francois C, *et al.* (2012). Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(8): 780-789.

Demonacos C, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB (2001). A TPR motif cofactor contributes to p300 activity in the p53 response. *Molecular cell* 8(1): 71-84.

Dewachter L, Adnot S, Fadel E, Humbert M, Maitre B, Barlier-Mur AM, *et al.* (2006). Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 174(9): 1025-1033.

Dewachter L, Adnot S, Guignabert C, Tu L, Marcos E, Fadel E, *et al.* (2009). Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 34(5): 1100-1110.

Di Agostino S, Strano S, Emiliozzi V, Zerbini V, Mottolese M, Sacchi A, *et al.* (2006). Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer cell* 10(3): 191-202.

Dib H, Tamby MC, Bussone G, Regent A, Berezne A, Lafine C, *et al.* (2012). Targets of anti-endothelial cell antibodies in pulmonary hypertension and scleroderma. *The European respiratory journal* 39(6): 1405-1414.

Ding K, Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Wang G, Qiu S, Shangary S, *et al.* (2006). Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *Journal of medicinal chemistry* 49(12): 3432-3435.

Do e Z, Fukumoto Y, Takaki A, Tawara S, Ohashi J, Nakano M, *et al.* (2009). Evidence for Rho-kinase activation in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 73(9): 1731-1739.

Doggrell SA (2005). Rho-kinase inhibitors show promise in pulmonary hypertension. *Expert opinion on investigational drugs* 14(9): 1157-1159.

- Dolenc J, Sebestjen M, Vrtovec B, Kozelj M, Haddad F (2014). Pulmonary hypertension in patients with advanced heart failure is associated with increased levels of interleukin-6. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*: 1-6.
- Dong JT, Chen C (2009). Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66(16): 2691-2706.
- Dorfmuller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 22(2): 358-363.
- Dorfmuller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, *et al.* (2002). Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(4): 534-539.
- Dornan D, Bheddah S, Newton K, Ince W, Frantz GD, Dowd P, *et al.* (2004a). COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer research* 64(20): 7226-7230.
- Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, *et al.* (2004b). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429(6987): 86-92.
- Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Sutendra G, Michelakis ED (2013a). Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation* 127(1): 115-125.
- Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, Qi AC, Bonnet S, Michelakis ED (2013b). Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Circulation research* 113(2): 126-136.
- Dromparis P, Sutendra G, Michelakis ED (2010). The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *J Mol Med (Berl)* 88(10): 1003-1010.
- Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, *et al.* (2003). Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 348(6): 500-509.
- Duan W, Gao L, Druhan LJ, Zhu WG, Morrison C, Otterson GA, *et al.* (2004). Expression of Pirh2, a newly identified ubiquitin protein ligase, in lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96(22): 1718-1721.
- Dumas de la Roque E, Savineau JP, Bonnet S (2010). Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics* 126(2): 186-199.

Dumitrascu R, Kulcke C, Konigshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, *et al.* (2011). Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *The European respiratory journal* 37(5): 1104-1118.

Durmowicz AG, Parks WC, Hyde DM, Mecham RP, Stenmark KR (1994). Persistence, re-expression, and induction of pulmonary arterial fibronectin, tropoelastin, and type I procollagen mRNA expression in neonatal hypoxic pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 145(6): 1411-1420.

Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, *et al.* (2003). Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 108(15): 1839-1844.

Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM, Dewachter L, Fadel E, Dartevielle P, *et al.* (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113(15): 1857-1864.

Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, *et al.* (2001). Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 108(8): 1141-1150.

Edlund K, Larsson O, Ameer A, Bunikis I, Gyllensten U, Leroy B, *et al.* (2012). Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(24): 9551-9556.

Eisenberg PR, Lucore C, Kaufman L, Sobel BE, Jaffe AS, Rich S (1990). Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 82(3): 841-847.

el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, *et al.* (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research* 54(5): 1169-1174.

Elias J, Dimitrio L, Clairambault J, Natalini R (2014). The p53 protein and its molecular network: modelling a missing link between DNA damage and cell fate. *Biochimica et biophysica acta* 1844(1 Pt B): 232-247.

Elliott RL, Blobel GC (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(9): 2078-2093.

Erster S, Mihara M, Kim RH, Petrenko O, Moll UM (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Molecular and cellular biology* 24(15): 6728-6741.

Essmann F, Schulze-Osthoff K (2012). Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *British journal of pharmacology* 165(2): 328-344.

- Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, *et al.* (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer research* 60(1): 129-133.
- Farkas D, Kraskauskas D, Drake JJ, Alhussaini AA, Kraskauskiene V, Bogaard HJ, *et al.* (2014). CXCR4 inhibition ameliorates severe obliterative pulmonary hypertension and accumulation of C-kit(+) cells in rats. *PLoS one* 9(2): e89810.
- Ferecatu I, Rincheval V, Mignotte B, Vayssiere JL (2009). Tickets for p53 journey among organelles. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14: 4214-4228.
- Ferrara N (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 25(4): 581-611.
- Fijalkowska I, Xu W, Comhair SA, Janocha AJ, Mavrakis LA, Krishnamachary B, *et al.* (2010). Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *The American journal of pathology* 176(3): 1130-1138.
- Fleg JL, Pina IL, Balady GJ, Chaitman BR, Fletcher B, Lavie C, *et al.* (2000). Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation* 102(13): 1591-1597.
- Fox BD, Shimony A, Langleben D (2011). Meta-analysis of monotherapy versus combination therapy for pulmonary arterial hypertension. *The American journal of cardiology* 108(8): 1177-1182.
- Frame MC (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* 1602(2): 114-130.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews* 62(3): 525-563.
- Frasch HF, Marshall C, Marshall BE (1999). Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American journal of physiology* 276(2 Pt 1): L304-310.
- Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL, Zambetti GP (1998). Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Molecular and cellular biology* 18(7): 3735-3743.
- Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, *et al.* (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *The American journal of pathology* 168(2): 659-669.

Frid MG, Kale VA, Stenmark KR (2002). Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circulation research* 90(11): 1189-1196.

Fridman JS, Lowe SW (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56): 9030-9040.

Fu L, Minden MD, Benchimol S (1996). Translational regulation of human p53 gene expression. *The EMBO journal* 15(16): 4392-4401.

Fujita H, Fukumoto Y, Saji K, Sugimura K, Demachi J, Nawata J, *et al.* (2010). Acute vasodilator effects of inhaled fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart and vessels* 25(2): 144-149.

Fukumoto J, Lockey R, Kolliputi N (2013). New hope for Nutlin-3a therapy for pulmonary arterial hypertension. *Frontiers in pharmacology* 4: 87.

Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, *et al.* (2005). Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart* 91(3): 391-392.

Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL (1984). Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 70(4): 580-587.

Galie N, Brundage BH, Ghofrani HA, Oudiz RJ, Simonneau G, Safdar Z, *et al.* (2009). Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119(22): 2894-2903.

Galie N, Corris PA, Frost A, Girgis RE, Granton J, Jing ZC, *et al.* (2013). Updated treatment algorithm of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62(25 Suppl): D60-72.

Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, *et al.* (2005). Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 353(20): 2148-2157.

Galie N, Manes A, Branzi A (2003). Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory medicine : drugs, devices, and other interventions* 2(2): 123-137.

Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, *et al.* (2008a). Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* 117(23): 3010-3019.

Galie N, Palazzini M, Manes A (2010). Pulmonary arterial hypertension: from the kingdom of the near-dead to multiple clinical trial meta-analyses. *European heart journal* 31(17): 2080-2086.

- Galie N, Rubin L, Hoeper M, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer G, *et al.* (2008b). Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 371(9630): 2093-2100.
- Gambaryan N, Cohen-Kaminsky S, Montani D, Girerd B, Huertas A, Seferian A, *et al.* (2012). Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 39(1): 210-212.
- Ganguli G, Wasyluk B (2003). p53-independent functions of MDM2. *Molecular cancer research : MCR* 1(14): 1027-1035.
- Garber K (2006). China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute* 98(5): 298-300.
- Garritano S, Inga A, Gemignani F, Landi S (2013). More targets, more pathways and more clues for mutant p53. *Oncogenesis* 2: e54.
- Gary-Bobo G, Houssaini A, Amsellem V, Rideau D, Pacaud P, Perrin A, *et al.* (2010). Effects of HIV protease inhibitors on progression of monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 122(19): 1937-1947.
- Geraci MW, Moore M, Gesell T, Yeager ME, Alger L, Golpon H, *et al.* (2001). Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circulation research* 88(6): 555-562.
- Ghofrani HA, Galie N, Grimminger F, Grunig E, Humbert M, Jing ZC, *et al.* (2013). Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 369(4): 330-340.
- Giaid A, Saleh D (1995). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 333(4): 214-221.
- Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, *et al.* (1993). Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 328(24): 1732-1739.
- Giannakakou P, Sackett DL, Ward Y, Webster KR, Blagosklonny MV, Fojo T (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nature cell biology* 2(10): 709-717.
- Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jais X, *et al.* (2010). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181(8): 851-861.

Glazova M, Aho TL, Palmetshofer A, Murashov A, Scheinin M, Koskinen PJ (2005). Pim-1 kinase enhances NFATc activity and neuroendocrine functions in PC12 cells. *Brain research. Molecular brain research* 138(2): 116-123.

Goncharov DA, Kudryashova TV, Ziai H, Ihida-Stansbury K, Delisser H, Krymskaya VP, *et al.* (2014). Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (mTORC2) Coordinates Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Metabolism, Proliferation, and Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 129(8): 864-874.

Grasberger BL, Lu T, Schubert C, Parks DJ, Carver TE, Koblisch HK, *et al.* (2005). Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *Journal of medicinal chemistry* 48(4): 909-912.

Green DR, Chipuk JE (2006). p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 126(1): 30-32.

Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, Frederick LS, Rabe KG, Sharma RG, *et al.* (2013). Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *British journal of haematology* 163(3): 326-333.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6): 883-899.

Groth A, Vrugt B, Brock M, Speich R, Ulrich S, Huber LC (2014). Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respiratory research* 15(1): 47.

Gu L, Zhu N, Zhang H, Durden DL, Feng Y, Zhou M (2009). Regulation of XIAP translation and induction by MDM2 following irradiation. *Cancer cell* 15(5): 363-375.

Gudkov AV, Komarova EA (2007). Dangerous habits of a security guard: the two faces of p53 as a drug target. *Human molecular genetics* 16 Spec No 1: R67-72.

Gudkov AV, Komarova EA (2005). Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* 331(3): 726-736.

Guignabert C, Izikki M, Tu LI, Li Z, Zadigue P, Barlier-Mur AM, *et al.* (2006). Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circulation research* 98(10): 1323-1330.

Guignabert C, Tu L, Izikki M, Dewachter L, Zadigue P, Humbert M, *et al.* (2009). Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(12): 4135-4147.

- Guignabert C, Tu L, Le Hiress M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, *et al.* (2013). Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 22(130): 543-551.
- Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, *et al.* (2009). RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179(12): 1151-1158.
- Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1815(2): 197-213.
- Halaby MJ, Yang DQ (2007). p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene* 395(1-2): 1-7.
- Hall S, Brogan P, Haworth SG, Klein N (2009). Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax* 64(9): 778-783.
- Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, Abraham RT, Giaccia AJ (2002). Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. *Molecular and cellular biology* 22(6): 1834-1843.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Hansmann G, de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Alvira CM, Guignabert C, Bekker JM, *et al.* (2008). An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 118(5): 1846-1857.
- Hansmann G, Zamanian RT (2009). PPARgamma activation: a potential treatment for pulmonary hypertension. *Science translational medicine* 1(12): 12ps14.
- Harris SL, Levine AJ (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17): 2899-2908.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387(6630): 296-299.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, *et al.* (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435(7043): 828-833.
- Heresi GA, AYTEKIN M, Newman J, Dweik RA (2010). CXC-chemokine ligand 10 in idiopathic pulmonary arterial hypertension: marker of improved survival. *Lung* 188(3): 191-197.

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, *et al.* (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular cell* 1(1): 3-11.

Herve P, Humbert M, Sitbon O, Parent F, Nunes H, Legal C, *et al.* (2001). Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clinics in chest medicine* 22(3): 451-458.

Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, *et al.* (1995). Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American journal of medicine* 99(3): 249-254.

Hinds P, Finlay C, Levine AJ (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *Journal of virology* 63(2): 739-746.

Hiremath J, Thanikachalam S, Parikh K, Shanmugasundaram S, Bangera S, Shapiro L, *et al.* (2010). Exercise improvement and plasma biomarker changes with intravenous treprostinil therapy for pulmonary arterial hypertension: a placebo-controlled trial. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 29(2): 137-149.

Hirose S, Hosoda Y, Furuya S, Otsuki T, Ikeda E (2000). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathology international* 50(6): 472-479.

Hoagland MS, Hoagland EM, Swanson HI (2005). The p53 inhibitor pifithrin-alpha is a potent agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314(2): 603-610.

Hock A, Vousden KH (2010). Regulation of the p53 pathway by ubiquitin and related proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42(10): 1618-1621.

Hoepfer MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, *et al.* (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62(25 Suppl): D42-50.

Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters* 420(1): 25-27.

Hopkins WE, Ochoa LL, Richardson GW, Trulock EP (1996). Comparison of the hemodynamics and survival of adults with severe primary pulmonary hypertension or Eisenmenger syndrome. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 15(1 Pt 1): 100-105.

Houssaini A, Abid S, Mouraret N, Wan F, Rideau D, Saker M, *et al.* (2013). Rapamycin reverses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48(5): 568-577.

- Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16): 7455-7460.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 271(50): 32253-32259.
- Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girerd B, Perros F, Montani D, *et al.* (2012). Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 40(4): 895-904.
- Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, *et al.* (2007). SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer research* 67(14): 6612-6618.
- Huh JW, Kim SY, Lee JH, Lee YS (2011). YC-1 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 24(6): 638-646.
- Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galie N, Boonstra A, *et al.* (2004a). Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension: BREATHE-2. *The European respiratory journal* 24(3): 353-359.
- Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, *et al.* (1995). Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 151(5): 1628-1631.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, *et al.* (2004b). Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43(12 Suppl S): 13S-24S.
- Humbert M, Segal ES, Kiely DG, Carlsen J, Schwierin B, Hoeper MM (2007). Results of European post-marketing surveillance of bosentan in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 30(2): 338-344.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, *et al.* (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine* 173(9): 1023-1030.
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004c). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 351(14): 1425-1436.
- Humbert M, Sitbon O, Yaici A, Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, *et al.* (2010). Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 36(3): 549-555.

Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(2): 424-428.

Iacopetta B, Wysocki S, Norman P, House A (1995). The p53 tumor-suppressor gene is overexpressed but not mutated in human atherosclerotic tissue. *International journal of oncology* 7(2): 399-402.

Ibrahim YF, Wong CM, Pavlickova L, Liu L, Trasar L, Bansal G, *et al.* (2014). Mechanism of the susceptibility of remodeled pulmonary vessels to drug-induced cell killing. *Journal of the American Heart Association* 3(1): e000520.

Iglarz M, Bossu A, Wanner D, Bortolamiol C, Rey M, Hess P, *et al.* (2014). Comparison of pharmacological activity of macitentan and bosentan in preclinical models of systemic and pulmonary hypertension. *Life sciences*.

Ihida-Stansbury K, McKean DM, Lane KB, Loyd JE, Wheeler LA, Morrell NW, *et al.* (2006). Tenascin-C is induced by mutated BMP type II receptors in familial forms of pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 291(4): L694-702.

Ihrle RA, Reczek E, Horner JS, Khachatryan L, Sage J, Jacks T, *et al.* (2003). Perp is a mediator of p53-dependent apoptosis in diverse cell types. *Current biology : CB* 13(22): 1985-1990.

Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, *et al.* (2004). Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature medicine* 10(12): 1321-1328.

Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, Kyotani S, Oya H, Sakamaki F, *et al.* (2006). Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* 11(2): 158-163.

Iwato M, Tachibana O, Tohma Y, Arakawa Y, Nitta H, Hasegawa M, *et al.* (2000). Alterations of the INK4a/ARF locus in human intracranial germ cell tumors. *Cancer research* 60(8): 2113-2115.

Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, *et al.* (2009). Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation* 119(3): 512-523.

Jiang P, Du W, Heese K, Wu M (2006). The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Molecular and cellular biology* 26(23): 9071-9082.

Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, *et al.* (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nature cell biology* 13(3): 310-316.

Jing ZC, Parikh K, Pulido T, Jerjes-Sanchez C, White RJ, Allen R, *et al.* (2013). Efficacy and safety of oral treprostinil monotherapy for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a randomized, controlled trial. *Circulation* 127(5): 624-633.

Johnson SR, Granton JT, Mehta S (2006a). Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* 130(2): 545-552.

Johnson SR, Mehta S, Granton JT (2006b). Anticoagulation in pulmonary arterial hypertension: a qualitative systematic review. *The European respiratory journal* 28(5): 999-1004.

Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M (1997). Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *The American journal of pathology* 150(4): 1349-1360.

Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoepfer MM, Gottlieb J, *et al.* (2011). Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. *The American journal of pathology* 179(1): 167-179.

Kanai M, Hanashiro K, Kim SH, Hanai S, Boulares AH, Miwa M, *et al.* (2007). Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation). *Nature cell biology* 9(10): 1175-1183.

Kaneko FT, Arroliga AC, Dweik RA, Comhair SA, Laskowski D, Oppedisano R, *et al.* (1998). Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158(3): 917-923.

Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Billiar TR, Ho C (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation* 104(8): 945-950.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research* 51(23 Pt 1): 6304-6311.

Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, *et al.* (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8424-8429.

Katsumoto T, Higaki K, Ohno K, Onodera K (1995). Cell-cycle dependent biosynthesis and localization of p53 protein in untransformed human cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 84(3): 167-173.

Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nature cell biology* 10(5): 611-618.

- Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC (2003). P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14(1): 128-138.
- Kemp K, Savale L, O'Callaghan DS, Jais X, Montani D, Humbert M, *et al.* (2012). Usefulness of first-line combination therapy with epoprostenol and bosentan in pulmonary arterial hypertension: an observational study. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 31(2): 150-158.
- Keogh AM, Mayer E, Benza RL, Corris P, Darteville PG, Frost AE, *et al.* (2009). Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54(1 Suppl): S67-77.
- Kherbeck N, Tamby MC, Bussone G, Dib H, Perros F, Humbert M, *et al.* (2013). The role of inflammation and autoimmunity in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension. *Clinical reviews in allergy & immunology* 44(1): 31-38.
- Khoury MP, Bourdon JC (2010). The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(3): a000927.
- Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, *et al.* (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature medicine* 6(8): 879-885.
- Kim E, Deppert W (2004). Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *Journal of cellular biochemistry* 93(5): 878-886.
- Kim EK, Lee JH, Oh YM, Lee YS, Lee SD (2010). Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Respirology* 15(4): 659-668.
- Kim SY, Lee JH, Huh JW, Kim HJ, Park MK, Ro JY, *et al.* (2012). Bortezomib alleviates experimental pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47(5): 698-708.
- Kitagawa M, Aonuma M, Lee SH, Fukutake S, McCormick F (2008a). E2F-1 transcriptional activity is a critical determinant of Mdm2 antagonist-induced apoptosis in human tumor cell lines. *Oncogene* 27(40): 5303-5314.
- Kitagawa M, Lee SH, McCormick F (2008b). Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300. *Molecular cell* 29(2): 217-231.
- Koblish HK, Zhao S, Franks CF, Donatelli RR, Tominovich RM, LaFrance LV, *et al.* (2006). Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 5(1): 160-169.

Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, *et al.* (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* 285(5434): 1733-1737.

Komarova EA, Gudkov AV (1998). Could p53 be a target for therapeutic suppression? *Seminars in cancer biology* 8(5): 389-400.

Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV (2003). p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 278(18): 15465-15468.

Komlodi-Pasztor E, Trostel S, Sackett D, Poruchynsky M, Fojo T (2009). Impaired p53 binding to importin: a novel mechanism of cytoplasmic sequestration identified in oxaliplatin-resistant cells. *Oncogene* 28(35): 3111-3120.

Kopec G, Moertl D, Steiner S, Stepien E, Mikolajczyk T, Podolec J, *et al.* (2013). Markers of thrombogenesis and fibrinolysis and their relation to inflammation and endothelial activation in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *PloS one* 8(12): e82628.

Kotsinas A, Aggarwal V, Tan EJ, Levy B, Gorgoulis VG (2012). PIG3: a novel link between oxidative stress and DNA damage response in cancer. *Cancer letters* 327(1-2): 97-102.

Koumenis C, Alarcon R, Hammond E, Sutphin P, Hoffman W, Murphy M, *et al.* (2001). Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Molecular and cellular biology* 21(4): 1297-1310.

Koyama M, Furuhashi M, Ishimura S, Mita T, Fuseya T, Okazaki Y, *et al.* (2014). Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306(9): H1314-1323.

Kracikova M, Akiri G, George A, Sachidanandam R, Aaronson SA (2013). A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell death and differentiation* 20(4): 576-588.

Kravchenko JE, Ilyinskaya GV, Komarov PG, Agapova LS, Kochetkov DV, Strom E, *et al.* (2008). Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17): 6302-6307.

Krymskaya VP, Snow J, Cesarone G, Khavin I, Goncharov DA, Lim PN, *et al.* (2011). mTOR is required for pulmonary arterial vascular smooth muscle cell proliferation under chronic hypoxia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(6): 1922-1933.

Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010). The essence of senescence. *Genes & development* 24(22): 2463-2479.

Kulawiec M, Ayyasamy V, Singh KK (2009). p53 regulates mtDNA copy number and mitochekpoint pathway. *Journal of carcinogenesis* 8: 8.

Kumpers P, Nickel N, Lukasz A, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, *et al.* (2010). Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European heart journal* 31(18): 2291-2300.

Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, *et al.* (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274(5289): 948-953.

Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, *et al.* (2008). Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer cell* 13(5): 454-463.

Laine A, Ronai Z (2007). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26(10): 1477-1483.

Laine A, Westermarck J (2014). Molecular Pathways: Harnessing E2F1 Regulation for Prosenescence Therapy in p53 Defective Cancer Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*.

Lambert JM, Gorzov P, Veprintsev DB, Soderqvist M, Segerback D, Bergman J, *et al.* (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer cell* 15(5): 376-388.

Lame MW, Jones AD, Wilson DW, Dunston SK, Segall HJ (2000). Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 275(37): 29091-29099.

Lame MW, Jones AD, Wilson DW, Segall HJ (2005). Monocrotaline pyrrole targets proteins with and without cysteine residues in the cytosol and membranes of human pulmonary artery endothelial cells. *Proteomics* 5(17): 4398-4413.

Lane DP, Cheok CF, Lain S (2010). p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(9): a001222.

Lane DP, Crawford LV (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278(5701): 261-263.

Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, *et al.* (2000). Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nature genetics* 26(1): 81-84.

- Lang M, Kojonazarov B, Tian X, Kalymbetov A, Weissmann N, Grimminger F, *et al.* (2012). The soluble guanylate cyclase stimulator riociguat ameliorates pulmonary hypertension induced by hypoxia and SU5416 in rats. *PLoS one* 7(8): e43433.
- Lannan KL, Phipps RP, White RJ (2014). Thrombosis, platelets, microparticles and PAH: more than a clot. *Drug discovery today*.
- Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149(2): 274-293.
- Lavoie JR, Ormiston ML, Perez-Iratxeta C, Courtman DW, Jiang B, Ferrer E, *et al.* (2014). Proteomic analysis implicates translationally controlled tumor protein as a novel mediator of occlusive vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 129(21): 2125-2135.
- Le Cam L, Linares LK, Paul C, Julien E, Lacroix M, Hatchi E, *et al.* (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 127(4): 775-788.
- Lee JT, Gu W (2013). SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes & cancer* 4(3-4): 112-117.
- Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM (1998). Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 101(5): 927-934.
- Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, *et al.* (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 112(6): 779-791.
- Lepetit H, Eddahibi S, Fadel E, Frisdal E, Munaut C, Noel A, *et al.* (2005). Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 25(5): 834-842.
- Lesprit P, Godeau B, Authier FJ, Soubrier M, Zuber M, Larroche C, *et al.* (1998). Pulmonary hypertension in POEMS syndrome: a new feature mediated by cytokines. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157(3 Pt 1): 907-911.
- Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature cell biology* 6(5): 443-450.
- Leuchte HH, Baezner C, Baumgartner RA, Bevec D, Bacher G, Neurohr C, *et al.* (2008). Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 32(5): 1289-1294.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-331.

- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302(5652): 1972-1975.
- Li M, Dong X, Liu Y, Sun X, Li Z, He J (2011a). Inhibition of ubiquitin proteasome function suppresses proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 384(6): 517-523.
- Li M, Riddle SR, Frid MG, El Kasmi KC, McKinsey TA, Sokol RJ, *et al.* (2011b). Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension. *J Immunol* 187(5): 2711-2722.
- Li Q, Lozano G (2013). Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19(1): 34-41.
- Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, *et al.* (2009). Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nature medicine* 15(11): 1289-1297.
- Li Y, Prives C (2007). Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene* 26(15): 2220-2225.
- Liang SH, Clarke MF (2001). Regulation of p53 localization. *European journal of biochemistry / FEBS* 268(10): 2779-2783.
- Liang Y, Liu J, Feng Z (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & bioscience* 3(1): 9.
- Lin AW, Lowe SW (2001). Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(9): 5025-5030.
- Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, *et al.* (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer research* 63(10): 2596-2605.
- Linzer DI, Levine AJ (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1): 43-52.
- Liu C, Chen J, Gao Y, Deng B, Liu K (2013). Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews* 2: CD004434.
- Liu P, Xu B, Cavalieri TA, Hock CE (2006). Pifithrin-alpha attenuates p53-mediated apoptosis and improves cardiac function in response to myocardial ischemia/reperfusion in aged rats. *Shock* 26(6): 608-614.

- Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, *et al.* (2004). Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 286(3): H933-939.
- Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, *et al.* (2009). Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation* 119(4): 566-576.
- Long L, MacLean MR, Jeffery TK, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, *et al.* (2006). Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circulation research* 98(6): 818-827.
- Loughran O, La Thangue NB (2000). Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Molecular and cellular biology* 20(6): 2186-2197.
- Lowe J, Cha H, Lee MO, Mazur SJ, Appella E, Fornace AJ, Jr. (2012). Regulation of the Wip1 phosphatase and its effects on the stress response. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17: 1480-1498.
- Lu X, Bijli KM, Ramirez A, Murphy TC, Kleinhenz J, Hart CM (2013). Hypoxia downregulates PPARgamma via an ERK1/2-NF-kappaB-Nox4-dependent mechanism in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Free radical biology & medicine* 63: 151-160.
- Lu X, Nguyen TA, Moon SH, Darlington Y, Sommer M, Donehower LA (2008). The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer metastasis reviews* 27(2): 123-135.
- Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, Munoz RM, Jiang P, Bigger JE, *et al.* (1996). Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Molecular and cellular biology* 16(11): 6009-6019.
- Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, *et al.* (2013). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 369(4): 351-361.
- Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ, Arthur JS (2006). Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC cell biology* 7: 1.
- Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, *et al.* (2006). Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human mutation* 27(2): 121-132.
- Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, *et al.* (2009). Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54(1 Suppl): S32-42.

MacLachlan TK, El-Deiry WS (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(14): 9492-9497.

MacLean MR, Herve P, Eddahibi S, Adnot S (2000). 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *British journal of pharmacology* 131(2): 161-168.

Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ, 3rd, Hill DE, *et al.* (1993). Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(11): 5100-5104.

Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G (2010). Autophagy regulation by p53. *Current opinion in cell biology* 22(2): 181-185.

Malhotra R, Paskin-Flerlage S, Zamanian RT, Zimmerman P, Schmidt JW, Deng DY, *et al.* (2013). Circulating angiogenic modulatory factors predict survival and functional class in pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation* 3(2): 369-380.

Malkin D (2011). Li-fraumeni syndrome. *Genes & cancer* 2(4): 475-484.

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, *et al.* (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105(2): 659-669.

Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX (2004). Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvascular research* 68(2): 75-103.

Mandegar M, Yuan JX (2002). Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascular pharmacology* 38(1): 25-33.

Manfredi JJ (2010). The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes & development* 24(15): 1580-1589.

Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X, *et al.* (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nature structural & molecular biology* 14(10): 912-920.

Marcel V, Dichtel-Danjou ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, *et al.* (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell death and differentiation* 18(12): 1815-1824.

Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO journal* 26(4): 923-934.

- Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, *et al.* (2004). Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circulation research* 94(9): 1263-1270.
- Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G (2006). Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell death and differentiation* 13(6): 927-934.
- Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang YH, *et al.* (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circulation research* 110(11): 1484-1497.
- Martin K, Trouche D, Hagemeyer C, Sorensen TS, La Thangue NB, Kouzarides T (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature* 375(6533): 691-694.
- Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM (2002). Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 106(8): 927-932.
- Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, *et al.* (2007). Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293(3): L548-554.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, *et al.* (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312(5780): 1650-1653.
- Mayo LD, Donner DB (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in biochemical sciences* 27(9): 462-467.
- Mazan-Mamczarz K, Galban S, Lopez de Silanes I, Martindale JL, Atasoy U, Keene JD, *et al.* (2003). RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(14): 8354-8359.
- McGoon MD, Frost AE, Oudiz RJ, Badesch DB, Galie N, Olschewski H, *et al.* (2009). Ambrisentan therapy in patients with pulmonary arterial hypertension who discontinued bosentan or sitaxsentan due to liver function test abnormalities. *Chest* 135(1): 122-129.
- McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, *et al.* (2009). ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology* 53(17): 1573-1619.

McLaughlin VV, Benza RL, Rubin LJ, Channick RN, Voswinckel R, Tapson VF, *et al.* (2010). Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. *Journal of the American College of Cardiology* 55(18): 1915-1922.

McLaughlin VV, Davis M, Cornwell W (2011). Pulmonary arterial hypertension. *Current problems in cardiology* 36(12): 461-517.

McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, *et al.* (2005). Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation* 115(6): 1479-1491.

McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, *et al.* (2004). Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circulation research* 95(8): 830-840.

Meloche J, Paulin R, Courboulin A, Lambert C, Barrier M, Bonnet P, *et al.* (2011). RAGE-dependent activation of the oncoprotein Pim1 plays a critical role in systemic vascular remodeling processes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(9): 2114-2124.

Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, *et al.* (2014). Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 129(7): 786-797.

Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M (2007). DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutation research* 621(1-2): 75-86.

Mercier I, Vuolo M, Madan R, Xue X, Levalley AJ, Ashton AW, *et al.* (2005). ARC, an apoptosis suppressor limited to terminally differentiated cells, is induced in human breast cancer and confers chemo- and radiation-resistance. *Cell death and differentiation* 12(6): 682-686.

Metcalfe S, Weeds A, Okorokov AL, Milner J, Cockman M, Pope B (1999). Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin. *Oncogene* 18(14): 2351-2355.

Meyrick B, Gamble W, Reid L (1980). Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *The American journal of physiology* 239(5): H692-702.

Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, *et al.* (2002). Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 105(2): 244-250.

Miele L, Golde T, Osborne B (2006). Notch signaling in cancer. *Current molecular medicine* 6(8): 905-918.

Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, *et al.* (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* 11(3): 577-590.

Milner J, Medcalf EA (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65(5): 765-774.

Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(16): 5000-5005.

Miwa S, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, Sugimura H, *et al.* (2006). Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner. *Biochemical and biophysical research communications* 340(1): 54-61.

Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Alhussaini A, Gomez-Arroyo J, Voelkel NF, *et al.* (2011). p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300(5): L753-761.

Mizuno S, Bogaard HJ, Voelkel NF, Umeda Y, Kadowaki M, Ameshima S, *et al.* (2009). Hypoxia regulates human lung fibroblast proliferation via p53-dependent and -independent pathways. *Respiratory research* 10: 17.

Mocanu MM, Yellon DM (2003). p53 down-regulation: a new molecular mechanism involved in ischaemic preconditioning. *FEBS letters* 555(2): 302-306.

Mohammad RM, Wu J, Azmi AS, Aboukameel A, Sosin A, Wu S, *et al.* (2009). An MDM2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals. *Molecular cancer* 8: 115.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic acids research* 26(15): 3453-3459.

Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmueller P, Price LC, *et al.* (2011). C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184(1): 116-123.

Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, Kirk A, MacLean MR (1999). 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT1B receptor. *British journal of pharmacology* 128(3): 730-734.

Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Desai AA, Singleton PA, Sammani S, *et al.* (2008). Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiological genomics* 33(2): 278-291.

Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, *et al.* (2001). 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* 104(7): 790-795.

- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, *et al.* (2009). Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1793(9): 1524-1532.
- Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, Hecker M, Zakrzewicz A, Kouri FM, *et al.* (2007). Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27(5): 1072-1078.
- Mouraret N, Marcos E, Abid S, Gary-Bobo G, Saker M, Houssaini A, *et al.* (2013). Activation of lung p53 by Nutlin-3a prevents and reverses experimental pulmonary hypertension. *Circulation* 127(16): 1664-1676.
- Mouthon L, Guillevin L, Humbert M (2005). Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *The European respiratory journal* 26(6): 986-988.
- Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP (1995). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer research* 55(24): 6161-6165.
- Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer surveys* 12: 197-217.
- Murphy KL, Dennis AP, Rosen JM (2000). A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14(14): 2291-2302.
- Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(9): 702-712.
- Murray F, MacLean MR, Pyne NJ (2002). Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *British journal of pharmacology* 137(8): 1187-1194.
- Mutka SC, Yang WQ, Dong SD, Ward SL, Craig DA, Timmermans PB, *et al.* (2009). Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity in vivo. *Cancer research* 69(2): 510-517.
- Nadaud S, Poirier O, Girerd B, Blanc C, Montani D, Eyries M, *et al.* (2013). Small platelet microparticle levels are increased in pulmonary arterial hypertension. *European journal of clinical investigation* 43(1): 64-71.
- Nagai R, Suzuki T, Aizawa K, Shindo T, Manabe I (2005). Significance of the transcription factor KLF5 in cardiovascular remodeling. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3(8): 1569-1576.

- Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, *et al.* (2005). Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171(5): 494-499.
- Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I, *et al.* (2004). Rho/Rho kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 287(4): L665-672.
- Napoli C, Ignarro LJ (2003). Nitric oxide-releasing drugs. *Annual review of pharmacology and toxicology* 43: 97-123.
- Narlik-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A (2014). The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. *Medicinal research reviews* 34(1): 136-159.
- Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, *et al.* (2011). Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Human mutation* 32(12): 1385-1389.
- Nawijn MC, Alendar A, Berns A (2011). For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 11(1): 23-34.
- Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, *et al.* (2001). Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(2): 289-298.
- Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips JA, 3rd, *et al.* (2001). Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *The New England journal of medicine* 345(5): 319-324.
- Nicolls MR, Mizuno S, Taraseviciene-Stewart L, Farkas L, Drake JI, Al Husseini A, *et al.* (2012). New models of pulmonary hypertension based on VEGF receptor blockade-induced endothelial cell apoptosis. *Pulmonary circulation* 2(4): 434-442.
- Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF (2005). Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *The European respiratory journal* 26(6): 1110-1118.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, *et al.* (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250): 705-708.
- North S, Pluquet O, Maurici D, El-Ghissassi F, Hainaut P (2002). Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature-sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothiols WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Molecular carcinogenesis* 33(3): 181-188.

- O'Brate A, Giannakakou P (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 6(6): 313-322.
- O'Reilly MA, Staversky RJ, Watkins RH, Reed CK, de Mesy Jensen KL, Finkelstein JN, *et al.* (2001). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 24(6): 703-710.
- Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, Morris KG, Kraskauskas D, Burns N, *et al.* (2007). Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation research* 100(6): 923-929.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358(6381): 80-83.
- Oliver TG, Meylan E, Chang GP, Xue W, Burke JR, Humpton TJ, *et al.* (2011). Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Molecular cell* 43(1): 57-71.
- Olovnikov IA, Kravchenko JE, Chumakov PM (2009). Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Seminars in cancer biology* 19(1): 32-41.
- Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, *et al.* (2002). Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 347(5): 322-329.
- Olsson KM, Delcroix M, Ghofrani HA, Tiede H, Huscher D, Speich R, *et al.* (2014). Anticoagulation and survival in pulmonary arterial hypertension: results from the Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension (COMPERRA). *Circulation* 129(1): 57-65.
- Ostriker A, Horita HN, Poczobutt J, Weiser-Evans MC, Nemenoff RA (2014). Vascular smooth muscle cell-derived transforming growth factor-beta promotes maturation of activated, neointima lesion-like macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34(4): 877-886.
- Oudiz RJ, Brundage BH, Galie N, Ghofrani HA, Simonneau G, Botros FT, *et al.* (2012). Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension: a double-blind 52-week uncontrolled extension study. *Journal of the American College of Cardiology* 60(8): 768-774.
- Overholtzer M, Rao PH, Favis R, Lu XY, Elowitz MB, Barany F, *et al.* (2003). The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(20): 11547-11552.
- Pan JJ, Zhang SW, Chen CB, Xiao SW, Sun Y, Liu CQ, *et al.* (2009). Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long-term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27(5): 799-804.

- Pan LC, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ (1991). Red blood cells augment transport of reactive metabolites of monocrotaline from liver to lung in isolated and tandem liver and lung preparations. *Toxicology and applied pharmacology* 110(2): 336-346.
- Pan Y, Haines DS (2000). Identification of a tumor-derived p53 mutant with novel transactivating selectivity. *Oncogene* 19(27): 3095-3100.
- Park WS, Firth AL, Han J, Ko EA (2010). Patho-, physiological roles of voltage-dependent K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi* 46(2): 89-105.
- Passman JN, Dong XR, Wu SP, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL, *et al.* (2008). A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1⁺ smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(27): 9349-9354.
- Patterson H, Barnes D, Gill S, Spicer J, Fisher C, Thomas M, *et al.* (1997). Amplification and Over-Expression of the MDM2 Gene in Human Soft Tissue Tumours. *Sarcoma* 1(1): 17-22.
- Paulin R, Courboulin A, Barrier M, Bonnet S (2011a). From oncoproteins/tumor suppressors to microRNAs, the newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 89(11): 1089-1101.
- Paulin R, Courboulin A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, *et al.* (2011b). Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 123(11): 1205-1215.
- Paulin R, Meloche J, Bonnet S (2012). STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *Jak-Stat* 1(4): 223-233.
- Paulin R, Meloche J, Jacob MH, Bissierier M, Courboulin A, Bonnet S (2011c). Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 301(5): H1798-1809.
- Paulin R, Michelakis ED (2014). The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circulation research* 115(1): 148-164.
- Peng Z (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human gene therapy* 16(9): 1016-1027.
- Perros F, Cohen-Kaminsky S, Humbert M (2008a). Understanding the role of CD4⁺CD25^(high) (so-called regulatory) T cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration; international review of thoracic diseases* 75(3): 253-256.

- Perros F, Dorfmuller P, Montani D, Hammad H, Waelput W, Girerd B, *et al.* (2012). Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185(3): 311-321.
- Perros F, Dorfmuller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Godot V, Capel F, *et al.* (2007a). Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 29(5): 937-943.
- Perros F, Dorfmuller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Mussot S, Mazmanian M, *et al.* (2007b). Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 29(3): 462-468.
- Perros F, Montani D, Dorfmuller P, Durand-Gasselini I, Tcherakian C, Le Pavec J, *et al.* (2008b). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178(1): 81-88.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, *et al.* (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* 28(6): 622-629.
- Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, *et al.* (2003). Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *The Journal of clinical investigation* 111(9): 1339-1346.
- Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, *et al.* (2004). Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43(12 Suppl S): 25S-32S.
- Pietra GG, Edwards WD, Kay JM, Rich S, Kernis J, Schloo B, *et al.* (1989). Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* 80(5): 1198-1206.
- Pietrancosta N, Moumen A, Dono R, Lingor P, Planchamp V, Lamballe F, *et al.* (2006). Imino-tetrahydro-benzothiazole derivatives as p53 inhibitors: discovery of a highly potent in vivo inhibitor and its action mechanism. *Journal of medicinal chemistry* 49(12): 3645-3652.
- Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, Limsuwan A, Krick S, Juhaszova M, *et al.* (2000). Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *American journal of physiology. Cell physiology* 279(5): C1540-1549.
- Plesnila N, von Baumgarten L, Retiounskaia M, Engel D, Ardeshiri A, Zimmermann R, *et al.* (2007). Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity. *Cell death and differentiation* 14(8): 1529-1541.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389(6648): 300-305.

Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, Thebaud B, Wu XC, Dyck JR, *et al.* (2003). In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation* 107(15): 2037-2044.

Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, *et al.* (2012). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141(1): 210-221.

Proietti De Santis L, Balajee AS, Lorenti Garcia C, Pepe G, Worboys AM, Palitti F (2003). Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin-alpha does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells. *DNA repair* 2(8): 891-900.

Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, Delcroix M, Galie N, Ghofrani HA, *et al.* (2013). Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 369(9): 809-818.

Pullamsetti SS, Berghausen EM, Dabral S, Tretyn A, Butrous E, Savai R, *et al.* (2012a). Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32(6): 1354-1365.

Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, *et al.* (2012b). Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185(4): 409-419.

Puszynski K, Hat B, Lipniacki T (2008). Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation. *Journal of theoretical biology* 254(2): 452-465.

Qiao L, Xie L, Shi K, Zhou T, Hua Y, Liu H (2012). Notch signaling change in pulmonary vascular remodeling in rats with pulmonary hypertension and its implication for therapeutic intervention. *PLoS one* 7(12): e51514.

Rabinovitch M (2012). Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation* 122(12): 4306-4313.

Rai PR, Cool CD, King JA, Stevens T, Burns N, Winn RA, *et al.* (2008). The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178(6): 558-564.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, *et al.* (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes & development* 14(1): 34-44.

- Ravi Y, Selvendiran K, Meduru S, Citro L, Naidu S, Khan M, *et al.* (2013). Dysregulation of PTEN in cardiopulmonary vascular remodeling induced by pulmonary hypertension. *Cell biochemistry and biophysics* 67(2): 363-372.
- Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, *et al.* (2012). Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *The lancet oncology* 13(11): 1133-1140.
- Reczek EE, Flores ER, Tsay AS, Attardi LD, Jacks T (2003). Multiple response elements and differential p53 binding control Perp expression during apoptosis. *Molecular cancer research : MCR* 1(14): 1048-1057.
- Rehman J, Archer SL (2010). A proposed mitochondrial-metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in fawn-hooded rats: the Warburg model of pulmonary arterial hypertension. *Advances in experimental medicine and biology* 661: 171-185.
- Reid MJ, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ (1998). Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of ¹⁴C-monocrotaline in rat liver microsomes. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 12(3): 157-166.
- Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, *et al.* (2007). Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Cell physiology* 292(5): C1837-1853.
- Remillard CV, Yuan JX (2004). Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286(1): L49-67.
- Ren W, Watts SW, Fanburg BL (2011). Serotonin transporter interacts with the PDGFbeta receptor in PDGF-BB-induced signaling and mitogenesis in pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300(3): L486-497.
- Rich S, Kaufmann E, Levy PS (1992). The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 327(2): 76-81.
- Rich S, Kieras K, Hart K, Groves BM, Stobo JD, Brundage BH (1986). Antinuclear antibodies in primary pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 8(6): 1307-1311.
- Richter A, Yeager ME, Zaiman A, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM (2004). Impaired transforming growth factor-beta signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 170(12): 1340-1348.
- Ries S, Korn WM (2002). ONYX-015: mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *British journal of cancer* 86(1): 5-11.

- Ritman EL (2005). Micro-computed tomography of the lungs and pulmonary-vascular system. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(6): 477-480, 501.
- Robles AI, Harris CC (2010). Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(3): a001016.
- Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau JP, Rousseau E, *et al.* (2009). Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery. *The European respiratory journal* 34(6): 1338-1347.
- Rolley N, Butcher S, Milner J (1995). Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene* 11(4): 763-770.
- Rosenberg HC, Rabinovitch M (1988). Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *The American journal of physiology* 255(6 Pt 2): H1484-1491.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, *et al.* (2002). Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine* 346(12): 896-903.
- Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, *et al.* (1990). Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Annals of internal medicine* 112(7): 485-491.
- Rudarakanchana N, Flanagan JA, Chen H, Upton PD, Machado R, Patel D, *et al.* (2002). Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human molecular genetics* 11(13): 1517-1525.
- Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32(43): 5129-5143.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature medicine* 11(12): 1306-1313.
- Safdar Z (2013). Pulmonary hypertension: a woman's disease. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 40(3): 302-303.
- Saha MN, Jiang H, Yang Y, Zhu X, Wang X, Schimmer AD, *et al.* (2012). Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS one* 7(1): e30215.
- Sakamaki F, Kyotani S, Nagaya N, Sato N, Oya H, Satoh T, *et al.* (2000). Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 102(22): 2720-2725.
- Sakao S, Tatsumi K (2011). Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. *International journal of cardiology* 147(1): 4-12.

- Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF (2009). Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respiratory research* 10: 95.
- Sampath J, Sun D, Kidd VJ, Grenet J, Gandhi A, Shapiro LH, *et al.* (2001). Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *The Journal of biological chemistry* 276(42): 39359-39367.
- Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiant G, Hsieh JK, Zhong S, *et al.* (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Molecular cell* 8(4): 781-794.
- Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, *et al.* (2007). Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176(10): 1041-1047.
- Sandoval J, Rothman A, Pulido T (2001). Atrial septostomy for pulmonary hypertension. *Clinics in chest medicine* 22(3): 547-560.
- Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS letters* 488(3): 110-115.
- Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, *et al.* (2012). Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(9): 897-908.
- Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, *et al.* (2009). Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respiratory research* 10: 6.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63(6): 1129-1136.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, *et al.* (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* 115(10): 2811-2821.
- Schultze AE, Roth RA (1998). Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* 1(4): 271-346.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer research* 64(7): 2627-2633.

- Scian MJ, Stagliano KE, Anderson MA, Hassan S, Bowman M, Miles MF, *et al.* (2005). Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Molecular and cellular biology* 25(22): 10097-10110.
- Scian MJ, Stagliano KE, Deb D, Ellis MA, Carchman EH, Das A, *et al.* (2004). Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene* 23(25): 4430-4443.
- Sdek P, Ying H, Chang DL, Qiu W, Zheng H, Touitou R, *et al.* (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Molecular cell* 20(5): 699-708.
- Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, *et al.* (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 21(10): 3436-3444.
- Selimovic N, Bergh CH, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B (2009). Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 34(3): 662-668.
- Sen N, Satija YK, Das S (2012). p53 and metabolism: old player in a new game. *Transcription* 3(3): 119-123.
- Seo YR, Fishel ML, Amundson S, Kelley MR, Smith ML (2002). Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21(5): 731-737.
- Sermeus A, Michiels C (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell death & disease* 2: e164.
- Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Experimental cell research* 196(1): 33-39.
- Shen J, Vakifahmetoglu H, Stridh H, Zhivotovsky B, Wiman KG (2008). PRIMA-1MET induces mitochondrial apoptosis through activation of caspase-2. *Oncogene* 27(51): 6571-6580.
- Sherr CJ, Weber JD (2000). The ARF/p53 pathway. *Current opinion in genetics & development* 10(1): 94-99.
- Shi G, Morrell CN (2011). Platelets as initiators and mediators of inflammation at the vessel wall. *Thrombosis research* 127(5): 387-390.
- Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, *et al.* (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Molecular cell* 4(3): 365-376.

Shimizu T, Fukumoto Y, Tanaka S, Satoh K, Ikeda S, Shimokawa H (2013). Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33(12): 2780-2791.

Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R (2009). A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *Journal of medical genetics* 46(5): 331-337.

Shu KX, Li B, Wu LX (2007). The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 55(1): 10-18.

Sigal A, Rotter V (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer research* 60(24): 6788-6793.

Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, *et al.* (2002). Continuous subcutaneous infusion of treprostinil, a prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 165(6): 800-804.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, *et al.* (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62(25 Suppl): D34-41.

Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, *et al.* (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54(1 Suppl): S43-54.

Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, *et al.* (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thrombosis and haemostasis* 97(3): 425-434.

Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, *et al.* (2005). Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 111(23): 3105-3111.

Sitbon O, Morrell N (2012). Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 21(126): 321-327.

Sklepkiwicz P, Schermuly RT, Tian X, Ghofrani HA, Weissmann N, Sedding D, *et al.* (2011). Glycogen synthase kinase 3beta contributes to proliferation of arterial smooth muscle cells in pulmonary hypertension. *PloS one* 6(4): e18883.

Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, *et al.* (2000). p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Molecular and cellular biology* 20(10): 3705-3714.

Sohn D, Graupner V, Neise D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2009). Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell death and differentiation* 16(6): 869-878.

Song H, Hollstein M, Xu Y (2007). p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nature cell biology* 9(5): 573-580.

Song Y, Jones JE, Beppu H, Keane JF, Jr., Loscalzo J, Zhang YY (2005). Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation* 112(4): 553-562.

Sonnenschein C, Soto AM (2013). The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *Journal of biosciences* 38(3): 651-663.

Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, *et al.* (2010). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122(9): 920-927.

Sousa H, Pando M, Breda E, Catarino R, Medeiros R (2011). Role of the MDM2 SNP309 polymorphism in the initiation and early age of onset of nasopharyngeal carcinoma. *Molecular carcinogenesis* 50(2): 73-79.

Soussi T, Lozano G (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 331(3): 834-842.

Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, Essahsah F, Voet van den Brink AM, Lantrua MG, *et al.* (2009). Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15(3): 1086-1095.

Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, *et al.* (2012). Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(3): 261-272.

Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, *et al.* (2006). Regulation of AIF expression by p53. *Cell death and differentiation* 13(12): 2140-2149.

Stankovic T, Skowronska A (2014). The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & lymphoma* 55(6): 1227-1239.

Starostik P, Manshour T, O'Brien S, Freireich E, Kantarjian H, Haidar M, *et al.* (1998). Deficiency of the ATM protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research* 58(20): 4552-4557.

Stegh AH (2012). Targeting the p53 signaling pathway in cancer therapy - the promises, challenges and perils. *Expert opinion on therapeutic targets* 16(1): 67-83.

Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation research* 104(2): 236-244, 228p following 244.

Stenmark KR, Frid MG, Yeager M, Li M, Riddle S, McKinsey T, *et al.* (2012). Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. *Pulmonary circulation* 2(1): 3-14.

Stenmark KR, Gerasimovskaya E, Nemenoff RA, Das M (2002). Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122(6 Suppl): 326S-334S.

Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009). Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297(6): L1013-1032.

Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, *et al.* (2011). The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology* 1(1): 141-161.

Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D (1991). Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Annals of internal medicine* 114(6): 464-469.

Sud N, Black SM (2009). Endothelin-1 impairs nitric oxide signaling in endothelial cells through a protein kinase Cdelta-dependent activation of STAT3 and decreased endothelial nitric oxide synthase expression. *DNA and cell biology* 28(11): 543-553.

Sugimoto M, Gromley A, Sherr CJ (2006). Hzf, a p53-responsive gene, regulates maintenance of the G2 phase checkpoint induced by DNA damage. *Molecular and cellular biology* 26(2): 502-512.

Sullivan CC, Du L, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, *et al.* (2003). Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21): 12331-12336.

Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, *et al.* (2010). Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Science translational medicine* 2(44): 44ra58.

Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, Zervopoulos S, Haromy A, Nagendran J, *et al.* (2013). A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 91(11): 1315-1327.

Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, *et al.* (2011). The role of Nogo and the mitochondria-endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Science translational medicine* 3(88): 88ra55.

- Sutendra G, Michelakis ED (2014). The Metabolic Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Cell metabolism* 19(4): 558-573.
- Suzuki YJ, Nagase H, Wong CM, Kumar SV, Jain V, Park AM, *et al.* (2007). Regulation of Bcl-xL expression in lung vascular smooth muscle. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36(6): 678-687.
- Sweeney C, Morrow D, Birney YA, Coyle S, Hennessy C, Scheller A, *et al.* (2004). Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18(12): 1421-1423.
- Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, *et al.* (2008). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177(12): 1377-1383.
- Tabernero J, Dirix L, Schoffski P, Cervantes A, Lopez-Martin JA, Capdevila J, *et al.* (2011). A phase I first-in-human pharmacokinetic and pharmacodynamic study of serdemetan in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(19): 6313-6321.
- Takagi M, Absalon MJ, McLure KG, Kastan MB (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123(1): 49-63.
- Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, *et al.* (2005). Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 60(9): 765-772.
- Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, *et al.* (2006). Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 28(4): 799-807.
- Tamosiuniene R, Nicolls MR (2011). Regulatory T cells and pulmonary hypertension. *Trends in cardiovascular medicine* 21(6): 166-171.
- Tang YA, Lin RK, Tsai YT, Hsu HS, Yang YC, Chen CY, *et al.* (2012). MDM2 overexpression deregulates the transcriptional control of RB/E2F leading to DNA methyltransferase 3A overexpression in lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(16): 4325-4333.
- Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, *et al.* (2005). Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic research in cardiology* 100(2): 131-138.

Tapson VF, Jing ZC, Xu KF, Pan L, Feldman J, Kiely DG, *et al.* (2013). Oral treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension in patients receiving background endothelin receptor antagonist and phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy (the FREEDOM-C2 study): a randomized controlled trial. *Chest* 144(3): 952-958.

Tapson VF, Torres F, Kermeen F, Keogh AM, Allen RP, Frantz RP, *et al.* (2012). Oral treprostinil for the treatment of pulmonary arterial hypertension in patients on background endothelin receptor antagonist and/or phosphodiesterase type 5 inhibitor therapy (the FREEDOM-C study): a randomized controlled trial. *Chest* 142(6): 1383-1390.

Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, *et al.* (2001). Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(2): 427-438.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, *et al.* (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature cell biology* 10(6): 676-687.

Teodoro JG, Evans SK, Green MR (2007). Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med (Berl)* 85(11): 1175-1186.

Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Broussard C, Bussone G, *et al.* (2008). Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 177(10): 1128-1134.

Thistlethwaite PA, Lee SH, Du LL, Wolf PL, Sullivan C, Pradhan S, *et al.* (2001). Human angiopoietin gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 122(1): 65-73.

Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, *et al.* (2000). Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *Journal of medical genetics* 37(10): 741-745.

Toba M, Alzoubi A, O'Neill KD, Gairhe S, Matsumoto Y, Oshima K, *et al.* (2014). Temporal hemodynamic and histological progression in Sugeng5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306(2): H243-250.

Toledo F, Wahl GM (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature reviews. Cancer* 6(12): 909-923.

Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, *et al.* (2009). Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180(8): 780-787.

- Tournier A, Wahl D, Chaouat A, Max JP, Regnault V, Lecompte T, *et al.* (2010). Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Thrombosis research* 126(6): e418-422.
- Toyoda Y, Thacker J, Santos R, Nguyen D, Bhama J, Bermudez C, *et al.* (2008). Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The Annals of thoracic surgery* 86(4): 1116-1122.
- Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, *et al.* (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The New England journal of medicine* 345(5): 325-334.
- Trigiant G, Lu X (2006). ASPP [corrected] and cancer. *Nature reviews. Cancer* 6(3): 217-226.
- Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, Boucek MM, Keck BM, Hertz MI (2006). Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult lung and heart-lung transplantation report--2006. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 25(8): 880-892.
- Tsuruya K, Yotsueda H, Ikeda H, Taniguchi M, Masutani K, Hayashida H, *et al.* (2008). Involvement of p53-transactivated Puma in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Life sciences* 83(15-16): 550-556.
- Tu L, De Man FS, Girerd B, Huertas A, Chaumais MC, Lecerf F, *et al.* (2012). A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186(7): 666-676.
- Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, *et al.* (2011). Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45(2): 311-322.
- Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, *et al.* (2013). Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62(25 Suppl): D4-12.
- Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, *et al.* (2001). Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *The Journal of pathology* 195(3): 367-374.
- Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, *et al.* (1999). Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 159(6): 1925-1932.
- Tuder RM, Davis LA, Graham BB (2012). Targeting energetic metabolism: a new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 185(3): 260-266.

- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *The American journal of pathology* 144(2): 275-285.
- Tuder RM, Voelkel NF (1998). Pulmonary hypertension and inflammation. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 132(1): 16-24.
- Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, *et al.* (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *The EMBO journal* 24(1): 160-169.
- Uldrijan S, Pannekoek WJ, Vousden KH (2007). An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *The EMBO journal* 26(1): 102-112.
- Ulrich S, Nicolls MR, Taraseviciene L, Speich R, Voelkel N (2008a). Increased regulatory and decreased CD8⁺ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration; international review of thoracic diseases* 75(3): 272-280.
- Ulrich S, Taraseviciene-Stewart L, Huber LC, Speich R, Voelkel N (2008b). Peripheral blood B lymphocytes derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension express a different RNA pattern compared with healthy controls: a cross sectional study. *Respiratory research* 9: 20.
- Van Hung T, Emoto N, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Suzuki Y, *et al.* (2014). Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor under hypoxia causes severe, human-like pulmonary arterial hypertension in mice: Potential roles of interleukin-6 and endothelin. *Life sciences*.
- van Oijen MG, Slootweg PJ (2000). Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6(6): 2138-2145.
- Varol E, Uysal BA, Ozaydin M (2011). Platelet indices in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 17(6): E171-174.
- Vaseva AV, Moll UM (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et biophysica acta* 1787(5): 414-420.
- Vassilev LT (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in molecular medicine* 13(1): 23-31.
- Vassilev LT (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3(4): 419-421.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303(5659): 844-848.

- Vivanco I, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* 2(7): 489-501.
- Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tuder RM (1998). Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* 114(3 Suppl): 225S-230S.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810): 307-310.
- Vousden KH, Lu X (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer* 2(8): 594-604.
- Vousden KH, Prives C (2009a). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137(3): 413-431.
- Vousden KH, Ryan KM (2009b). p53 and metabolism. *Nature reviews. Cancer* 9(10): 691-700.
- Wagner JG, Petry TW, Roth RA (1993). Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-linking in pulmonary artery endothelium. *The American journal of physiology* 264(5 Pt 1): L517-522.
- Wang H, Ma X, Ren S, Buolamwini JK, Yan C (2011). A small-molecule inhibitor of MDMX activates p53 and induces apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 10(1): 69-79.
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature cell biology* 1(1): 20-26.
- Weilbacher A, Gutekunst M, Oren M, Aulitzky WE, van der Kuip H (2014). RITA can induce cell death in p53-defective cells independently of p53 function via activation of JNK/SAPK and p38. *Cell death & disease* 5: e1318.
- Weinberg RL, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR (2005). Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *Journal of molecular biology* 348(3): 589-596.
- Weinmann L, Wischhusen J, Demma MJ, Naumann U, Roth P, Dasmahapatra B, *et al.* (2008). A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* 15(4): 718-729.
- Weisz L, Oren M, Rotter V (2007). Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 26(15): 2202-2211.
- Welsh CH, Hassell KL, Badesch DB, Kressin DC, Marlar RA (1996). Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 110(3): 710-717.

- Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, *et al.* (2005). Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172(1): 105-113.
- White RJ, Meoli DF, Swarhout RF, Kallop DY, Galaria, II, Harvey JL, *et al.* (2007). Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 293(3): L583-590.
- Wilkong MJ, Singh C, Nihal M, Zhong W, Ahmad N (2014). SIRT1 deacetylase is overexpressed in human melanoma and its small molecule inhibition imparts anti-proliferative response via p53 activation. *Archives of biochemistry and biophysics*.
- Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK (1989). Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvascular research* 38(1): 57-80.
- Wiman KG (2010). Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29(30): 4245-4252.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(2): 606-612.
- Wong WK, Knowles JA, Morse JH (2005). Bone morphogenetic protein receptor type II C-terminus interacts with c-Src: implication for a role in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33(5): 438-446.
- Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X (2009). Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev* 18(1): 50-55.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development* 7(7A): 1126-1132.
- Xiao Y, Gong D, Wang W (2013). Soluble JAGGED1 inhibits pulmonary hypertension by attenuating notch signaling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33(12): 2733-2739.
- Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, *et al.* (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 375(6533): 694-698.
- Xu DQ, Luo Y, Liu Y, Wang J, Zhang B, Xu M, *et al.* (2010). Beta-estradiol attenuates hypoxic pulmonary hypertension by stabilizing the expression of p27kip1 in rats. *Respiratory research* 11: 182.
- Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, *et al.* (2004). Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 18(14): 1746-1748.

Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, *et al.* (2007). Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(4): 1342-1347.

Yang A, McKeon F (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nature reviews. Molecular cell biology* 1(3): 199-207.

Yang C, Wang S, Liang T, Wang J, Wang K, Wang B (2001). The roles of bcl-2 gene family in the pulmonary artery remodeling of hypoxia pulmonary hypertension in rats. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 16(3): 182-184.

Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Seyed M, Li Z, *et al.* (2006). MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Molecular and cellular biology* 26(19): 7269-7282.

Yang W, Rozan LM, McDonald ER, 3rd, Navaraj A, Liu JJ, Matthew EM, *et al.* (2007). CARPs are ubiquitin ligases that promote MDM2-independent p53 and phospho-p53ser20 degradation. *The Journal of biological chemistry* 282(5): 3273-3281.

Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, *et al.* (2005a). Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation research* 96(10): 1053-1063.

Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV, *et al.* (2005b). Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer cell* 7(6): 547-559.

Yang ZX, Wang D, Wang G, Zhang QH, Liu JM, Peng P, *et al.* (2010). Clinical study of recombinant adenovirus-p53 combined with fractionated stereotactic radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136(4): 625-630.

Yeager ME, Frid MG, Stenmark KR (2011). Progenitor cells in pulmonary vascular remodeling. *Pulmonary circulation* 1(1): 3-16.

Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, Voelkel NF, Tudor RM (2001). Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circulation research* 88(1): E2-E11.

Yeager ME, Reddy MB, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR (2012). Activation of the unfolded protein response is associated with pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation* 2(2): 229-240.

Yu L, Hales CA (2011). Silencing of sodium-hydrogen exchanger 1 attenuates the proliferation, hypertrophy, and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via E2F1. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45(5): 923-930.

Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, but not p21WAF1/Cip1, is required for inhibition of hypoxia-induced pulmonary hypertension and remodeling by heparin in mice. *Circulation research* 97(9): 937-945.

Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA (2006). Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochemical and biophysical research communications* 345(4): 1565-1572.

Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV, Jr., Gaine SP, *et al.* (1998a). Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 98(14): 1400-1406.

Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ (1998b). Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* 351(9104): 726-727.

Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, Mirshahidi HR (2011). Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *Journal of hematology & oncology* 4: 16.

Zache N, Lambert JM, Rokaesus N, Shen J, Hainaut P, Bergman J, *et al.* (2008). Mutant p53 targeting by the low molecular weight compound STIMA-1. *Molecular oncology* 2(1): 70-80.

Zaiman AL, Damico R, Thoms-Chesley A, Files DC, Kesari P, Johnston L, *et al.* (2011). A critical role for the protein apoptosis repressor with caspase recruitment domain in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 124(23): 2533-2542.

Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Muller M, Wallach D, Goncharov TM, *et al.* (2003). Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* 22(36): 5667-5676.

Zeimet AG, Marth C (2003). Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *The lancet oncology* 4(7): 415-422.

Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, *et al.* (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18(18): 2892-2900.

Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ, *et al.* (2011a). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(39): 16259-16264.

Zhang D, Wang G, Han D, Zhang Y, Xu J, Lu J, *et al.* (2014). Activation of PPAR-gamma ameliorates pulmonary arterial hypertension via inducing heme oxygenase-1 and p21(WAF1): An in vivo study in rats. *Life sciences* 98(1): 39-43.

Zhang H, Xu M, Xia J, Qin RY (2013). Association between serotonin transporter (SERT) gene polymorphism and idiopathic pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis and review of the literature. *Metabolism: clinical and experimental* 62(12): 1867-1875.

Zhang L, Yu D, Hu M, Xiong S, Lang A, Ellis LM, *et al.* (2000). Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer research* 60(13): 3655-3661.

Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, *et al.* (2003). Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 285(3): L740-754.

Zhang XP, Liu F, Wang W (2011b). Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(22): 8990-8995.

Zhang Y, Kohler K, Xu J, Lu D, Braun T, Schlitt A, *et al.* (2011c). Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50(3): 471-478.

Zhang Z, Wang H, Li M, Rayburn ER, Agrawal S, Zhang R (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene* 24(48): 7238-7247.

Zhou J, Ahn J, Wilson SH, Prives C (2001). A role for p53 in base excision repair. *The EMBO journal* 20(4): 914-923.

Zhou S, Kachhap S, Singh KK (2003). Mitochondrial impairment in p53-deficient human cancer cells. *Mutagenesis* 18(3): 287-292.

Zhu B, Wang L, Sun L, Cao R (2012). Combination therapy improves exercise capacity and reduces risk of clinical worsening in patients with pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Journal of cardiovascular pharmacology* 60(4): 342-346.

Zhu P, Huang L, Ge X, Yan F, Wu R, Ao Q (2006). Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *International journal of experimental pathology* 87(6): 463-474.

Zhu X, Yu QS, Cutler RG, Culmsee CW, Holloway HW, Lahiri DK, *et al.* (2002). Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzoxazole derivatives. *Journal of medicinal chemistry* 45(23): 5090-5097.

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, *et al.* (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes & development* 12(15): 2424-2433.

Zuo XR, Zhang R, Jiang X, Li XL, Zong F, Xie WP, *et al.* (2012). Usefulness of intravenous adenosine in idiopathic pulmonary arterial hypertension as a screening agent for identifying long-term responders to calcium channel blockers. *The American journal of cardiology* 109(12): 1801-1806.

◆ Résumé de la thèse

Dans le contexte du phénotype « pseudo-tumoral » de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), nous avons caractérisé le rôle de la protéine p53 chez les patients atteints d'HTAP idiopathique et dans des modèles *in vivo* d'HTAP expérimentale. Il semblerait que p53 soit inactivée dans les phases initiatrices du développement de l'HTAP. Aux stades installés et sévères de la pathologie, il y aurait une normalisation de p53; cependant une augmentation de son principal régulateur, la protéine MDM2, semble être une cible thérapeutique potentiellement intéressante.

◆ Mots clés relatifs au sujet de la thèse

Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), protéine p53, cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires, pifithrin- α , protéine MDM2, Nutlin-3a

◆ Nom du laboratoire de rattachement

Unité INSERM U999 :

"Hypertension Artérielle Pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique"

Centre Chirurgical Marie Lannelongue

133 Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis Robinson, France

PÔLE : PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex, FRANCE