



**HAL**  
open science

**Vers une thérapie pour deux maladies vasculaires rares :  
criblage de chimiothèques de médicaments pour les  
maladies Rendu-Osler et Hypertension Artérielle  
Pulmonaire**

Florian Robert

► **To cite this version:**

Florian Robert. Vers une thérapie pour deux maladies vasculaires rares : criblage de chimiothèques de médicaments pour les maladies Rendu-Osler et Hypertension Artérielle Pulmonaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV039 . tel-02613834

**HAL Id: tel-02613834**

**<https://theses.hal.science/tel-02613834>**

Submitted on 20 May 2020

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

### **Florian ROBERT**

Thèse dirigée par **Jean-Jacques FEIGE, PhD**, Directeur de Recherche INSERM, BCI UMR INSERM-CEA-UGA 1036  
et par **Sabine BAILLY, PhD**, Directrice de Recherche INSERM,  
BCI UMR INSERM-CEA-UGA 1036

préparée au sein du laboratoire **Biologie du Cancer et de  
l'Infection**  
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

## **Vers une thérapie pour deux maladies vasculaires rares : Criblage de chimiothèques de médicaments pour les maladies Rendu-Osler et Hypertension Artérielle Pulmonaire**

Thèse soutenue publiquement le **22 Novembre 2019**  
devant le jury composé de :

#### **Mr Ahcène BOUMENDJEL, PhD**

Professeur de Chimie Médicinale, Faculté de Pharmacie de Grenoble,  
Directeur du Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR CNRS-  
UGA 5063, *Président*

#### **Mr Laurent PREZEAU, PhD**

Directeur de Recherche CNRS, Directeur Scientifique de la Plateforme  
Technologique ARPEGE, Institut de Génomique Fonctionnelle,  
Montpellier, *Rapporteur*

#### **Mr Fabrice SONCIN, PhD**

Directeur de Recherche INSERM, UMI CNRS-Univ Lille 2820, LIMMS-  
IIS, IRCL, Lille, *Rapporteur*

#### **Mme Sophie DUPUIS-GIROD, MD-PhD**

Praticien Hospitalier des Hospices Civils de Lyon, Directrice du Centre  
National de Référence pour la maladie de Rendu-Osler, *Membre*



# Table des matières

Remerciements.....	4
Introduction .....	5
<b>1. Systèmes Cardiovasculaire et Pulmonaire.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Introduction au système cardiovasculaire.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Historique de la physiologie cardiovasculaire .....	5
1.1.2 Anatomie et physiologie cardio-vasculaire .....	8
1.1.3 Anatomie cardiaque et fonctionnement .....	9
1.1.4 Pathologies cardio-vasculaires et enjeux.....	16
1.1.5 Malformations veineuses et artério-veineuses (MAV) .....	17
<b>1.2 Introduction au système pulmonaire et respiratoire.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Historique de la respiration : travaux de Lavoisier et Laplace .....	23
1.2.2 Anatomie pulmonaire et fonctionnement.....	25
1.2.3 Mécanisme de la respiration : Respiration, Pression partielle gazeuse et pH sanguin.....	28
<b>2 Famille des Bone Morphogenetic Proteins (BMP).....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Découverte des BMPs.....</b>	<b>33</b>
2.1.5 Travaux préliminaires .....	33
2.1.6 Travaux de Marshall R. Urist .....	33
2.1.7 Identification des BMPs.....	34
<b>2.2 Présentation de la famille des BMPs .....</b>	<b>35</b>
2.2.5 Classification et structure des BMPs.....	35
2.2.6 Récepteurs aux BMPs .....	37
2.2.7 Signalisation intracellulaire .....	38
2.2.8 Gènes cibles de la voie.....	40
<b>2.3 Régulation de la voie .....</b>	<b>42</b>
2.3.5 Répression de la voie .....	42
2.3.6 Potentialisation de la voie .....	43
<b>2.4 Lieux d'expression des BMPs .....</b>	<b>44</b>
<b>2.5 La voie de signalisation BMP9.....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 Rôle vasculaire de la voie BMP9.....</b>	<b>46</b>
<b>3 La voie BMP9 dans HTAP et HHT.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Télangiectasies Hémorragiques Héréditaires .....</b>	<b>48</b>
3.1.1 Présentation de la pathologie .....	48
3.1.2 Traitements actuels .....	50
3.1.3 Modèles animaux HHT .....	55

3.2	Hypertension Artérielle Pulmonaire .....	60
3.2.5	Présentation de la pathologie .....	60
3.2.6	Traitements actuels .....	62
3.2.7	Modèle animaux HTAP .....	66
4	Criblage de chimiothèques en vue d'un traitement d'HHT et HTAP .....	69
4.1	Introduction au Criblage à Haut Débit et au repositionnement thérapeutique .....	69
4.2	Criblage à Haut Débit dans HTAP et HHT .....	74
4.2.5	Criblage sur C2C12BRA .....	75
4.2.6	Cellules endothéliales dérivées de cellules souches embryonnaires humaine (hESC derived ECs).....	76
4.2.7	Criblage phénotypique .....	77
	Objectifs .....	79
	Résultats.....	80
1.	Développement d'un test cellulaire rapportant la voie de signalisation BMP9-ALK1-SMAD1/5.....	80
1.1	Choix du modèle cellulaire .....	80
1.2	Choix du mode de lecture.....	80
1.3	Mise au point du test de criblage en 96 puits au robot.....	82
1.3.1	Sous Clonage BRE.....	82
1.3.2	Etablissement de la lignée stable HMEC BRE MetLuc .....	83
1.3.3	Validation de la réponse BMP9 chez les cellules HMEC – MetLuc.....	84
1.3.4	Robustesse du Test .....	87
1.3.5	Protocole de criblage pour HMEC-MetLuc.....	89
1.3.6	Choix de la chimiothèque Prestwick .....	92
2.	Criblage de la chimiothèque Prestwick.....	93
2.1	Présentation du Criblage .....	93
2.2	Résultats du criblage de Prestwick : Bacitracine .....	94
3.	Développement d'un deuxième test de criblage : HMEC-1 FR Luc.....	98
3.1	Choix de la chimiothèque : TargetMol.....	101
3.2	Protocole de criblage .....	102
4.	Résultats du criblage de TargetMol : Epinéphrine et Norépinéphrine .....	103
5.	Criblage de la chimiothèque de Prestwick sur le modèle HMEC FR Luc .....	109
5.1	Protocole de Criblage.....	109
5.2	Résultats du criblage : Alprostadil et Dinoprost.....	110
6.	Criblage manuel de Prestwick sur C2C12 BRA .....	112
6.1	Présentation des C2C12 BRA .....	112

6.2 Résultats du criblage manuel : molécules X. et Y. ....	114
Matériels et Méthodes .....	117
Discussions & Perspectives.....	123
Annexes.....	133
Références bibliographiques .....	164
Liste des Abréviations (dans l'ordre d'apparition) .....	188
Abstracts .....	193
Résumé.....	193

## Remerciements

Je remercie en premier lieu le Professeur Ahcène Boumendjel, le Docteur Laurent Prézeau, le Docteur Fabrice Soncin et enfin le Docteur Sophie Dupuis-Girod de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie ensuite le Docteur Sabine Bailly et le Docteur Jean-Jacques Feige pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire BCI et encadré tout au long de ma thèse. Merci à vous pour m'avoir permis de mener ce projet de recherche, et m'avoir enseigné les compétences nécessaires pour développer les différents outils qui ont servi à celle-ci.

Un grand merci à Caroline Barette et Marie-Odile Fauvarque de la plateforme CMBA, sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour, toujours pleines de conseils avisés, pertinents et rigoureux.

Je remercie également l'équipe BAL, pour la qualité des techniques enseignées qui m'ont permis de toujours réaliser des expériences qualitatives.

Un merci plus singulier pour Daniel et Mariela, toujours ouvert à la discussion, positif et de bonne humeur.

Un grand merci à Fred, pour la bonne ambiance quotidienne au bureau nécessaire à l'avancement de la thèse.

Merci à Philippe Marambaud, qui m'a accueilli à bras ouvert dans son laboratoire à New-York, avec qui j'ai pu avoir une discussion fortuite sur mon travail, et qui sait redonner un coup de boost pour la thèse.

Enfin, je remercie ma famille, plus particulièrement mes parents, qui m'ont toujours encouragé à développer ma curiosité et m'ont soutenu dans mes études.

Et pour finir, un énorme merci à ma femme Sarah, pilier de soutien indéfectible, sans qui je n'aurais jamais mené à bien cette thèse. Pour tout ce que tu fais pour moi, je te remercie indéfiniment.

# Introduction

## 1. Systèmes Cardiovasculaire et Pulmonaire

### 1.1 Introduction au système cardiovasculaire

#### 1.1.1 Historique de la physiologie cardiovasculaire

##### 1.1.1.1 Médecine cardiaque de l'antiquité : Galien

Claude Galien, ou *Claudius Galenus* (131 – 201 Après J.C) était un médecin grec, considéré comme « prince des médecins » par André Vésale, ce dernier contribuant par ses talents de dissection avec William Harvey à la compréhension du système cardiovasculaire tel que nous le connaissons aujourd'hui. Galien, par ses travaux et théories, publia son savoir dans son œuvre « *De Usu Partium* » (De l'utilité des parties du corps) dans lequel il décrit entre autres sa vision de la circulation sanguine. Les médecins de l'antiquité et notamment Aristote (*Parties des Animaux*, 330 avant J.C) décrivaient déjà le cœur comme centre du corps et du sang, permettant la vie à travers les artères (pas encore les veines), et constataient que l'esprit mourrait peu après l'arrêt des battements cardiaques, supposant alors que l'esprit résidait dans le cœur. Cependant, leurs savoirs étaient limités puisqu'ils ne pratiquaient pas de dissection. Les premières autopsies arrivèrent alors pendant le III<sup>ème</sup> siècle avant J.C avec des médecins comme Hérophile de Calcédoine et Erasistrate de Céos. Galien reprit alors leurs travaux et les poursuivit, notamment ceux d'Hérophile, qu'il publia dans son ouvrage *De Usu Partium*. Il y mit en avant les deux états du sang : veineux et artériel, distribué par le foie. Le sang artériel distribue le *pneuma*, provenant des poumons et de l'air inspiré, et subit une combustion dans le cœur puis est envoyé vers le foie, devenant le sang permettant la chaleur du corps. Les aliments utiles issus de la digestion par l'estomac, sont envoyés au foie pour subir une « coction » (le reste étant éliminé en fèces), et ainsi transformés en sang veineux qui devient le sang nutritif pour les organes. Le foie distribue ensuite ces deux sangs dans l'intégralité du corps humain, et les déchets de cette consommation périphérique seraient expulsés par la transpiration. Ces descriptions aujourd'hui fantasmées et obsolètes ont tout de

même perduré pendant environ 15 siècles jusqu'à l'arrivée de la médecine moderne, avec notamment William Harvey.

### 1.1.1.2 Médecine cardiaque moderne: William Harvey

William Harvey (1578-1657) était un médecin anglais qui a posé les bases de la physiologie cardiovasculaire moderne. Il a en effet regroupé nombre de travaux de ses prédécesseurs et les poursuivit dans son œuvre *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* (Exercice anatomique sur le mouvement du cœur et du sang chez les animaux, 1628), qui comme André Vésale (1514-1564), constatèrent les erreurs proposées par Galien, grâce aux dissections effectuées sur corps humains. Parmi les travaux compilés, on retrouve ceux d'André Vésale, qui put décrire la réelle anatomie cardiaque que nous lui connaissons aujourd'hui, ainsi que sa physiologie contractile automatique. D'autres travaux importants ont également été regroupés dans cette œuvre. On y trouve les travaux de Michel Servet (1546), qui montra l'existence d'une circulation pulmonaire et d'une cloison ventriculaire, empêchant « deux sangs distincts de se rejoindre » ; et aussi les travaux de Realdo Colombo parus dans *De re anatomica* (1559) montrant l'échange sanguin entre le cœur et les poumons, et décrivant les phases contractiles (systoles) et de repos (diastole) définissant ainsi le cycle cardiaque, en montrant bien que le sang provenant des poumons ne véhicule pas d'oxygène (le *Pneuma* de Galien) mais bien du sang. Enfin, Andrea Cesalpino montra que le sang veineux circulait des membres vers le cœur. Une fois tous ces travaux regroupés, William Harvey pu les poursuivre et les approfondir, et publia ainsi *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* en 1628, montrant par ailleurs ses déductions et ses propres expérimentations qui sont encore d'actualité dans la médecine moderne. Il décrit ainsi la petite et la grande circulation, notamment par l'expérience suivante (Figure 1) :

« Si on établit un lien sur le bras, au-dessus du coude, à intervalles réguliers, on observe des renflements ou des nœuds sur l'avant-bras. Ils sont formés par des valvules (Figure 1.1). Si vous pressez la veine de manière à chasser le sang, vous ne verrez pas le sang refluer (Figure 1.2). Si maintenant vous appliquez un doigt de l'autre main sur la partie distendue de la veine au-dessus de la valvule et si vous pressez vers le bas (partie distale du bras), vous constaterez que vous ne pouvez pas pousser le sang de l'autre côté de la valvule (Figure 1.3 et 1.4). Il apparaît ainsi que la valvule empêche tout reflux sanguin. C'est la preuve que dans les veines, le sang



coule des parties inférieures aux parties supérieures (des membres vers le corps, vers le cœur) ».

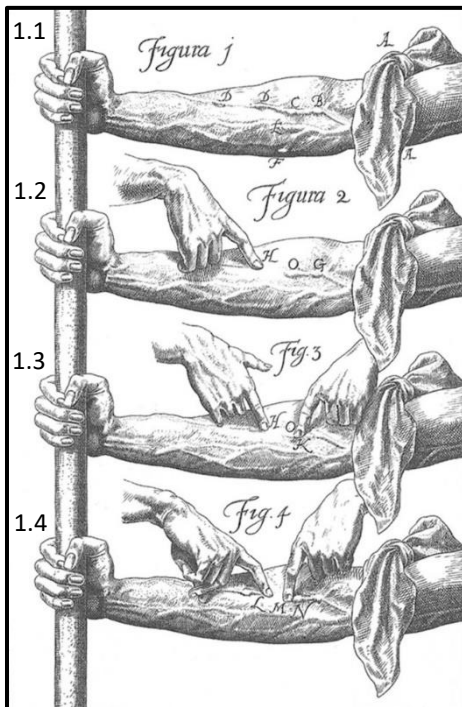


Figure 1 : Figure 1.1 à 1.4 issue de *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* de William Harvey, publié en 1628, démontrant la présence de valvules veineuses et ainsi la circulation veineuse. (1.) : Un garrot permet d'observer la présence de nœuds sur les veines. (2.) : L'application d'une pression distale sur le bras (H) ne fait pas revenir le sang vers la main. (3.) (4.) : Si l'on fait de même qu'en (2.) et en cherchant à repousser le sang vers la partie distale, la valvule empêchera tout reflux sanguin.

Ces travaux permettent ainsi de comprendre le sens unidirectionnel de la circulation sanguine. De plus, Harvey montre par différentes mesures les volumes de sang expulsés à chaque battement du cœur, rapportés au nombre de battements par jour. Il obtient par ce calcul plusieurs centaines de kilogrammes de sang par jour véhiculés par le cœur, ce qui lui semble impossible par les dires de Galien, qui montrait que le sang provenait de l'alimentation. Il en déduit ainsi une circulation sanguine, dont le cœur est une pompe faisant circuler un volume sanguin fini. Cependant, il n'est pas sûr du lien unissant le sang artériel et le sang veineux, affirmant qu'il faut qu'il y ait un passage entre les deux, et se risque à proposer que celui-ci se fait par les organes. C'est finalement Marcello Malpighi, en 1661, qui découvre les capillaires sanguins permettant la vascularisation des organes grâce aux améliorations du microscope permises par Antoni van Leeuwenhoek.

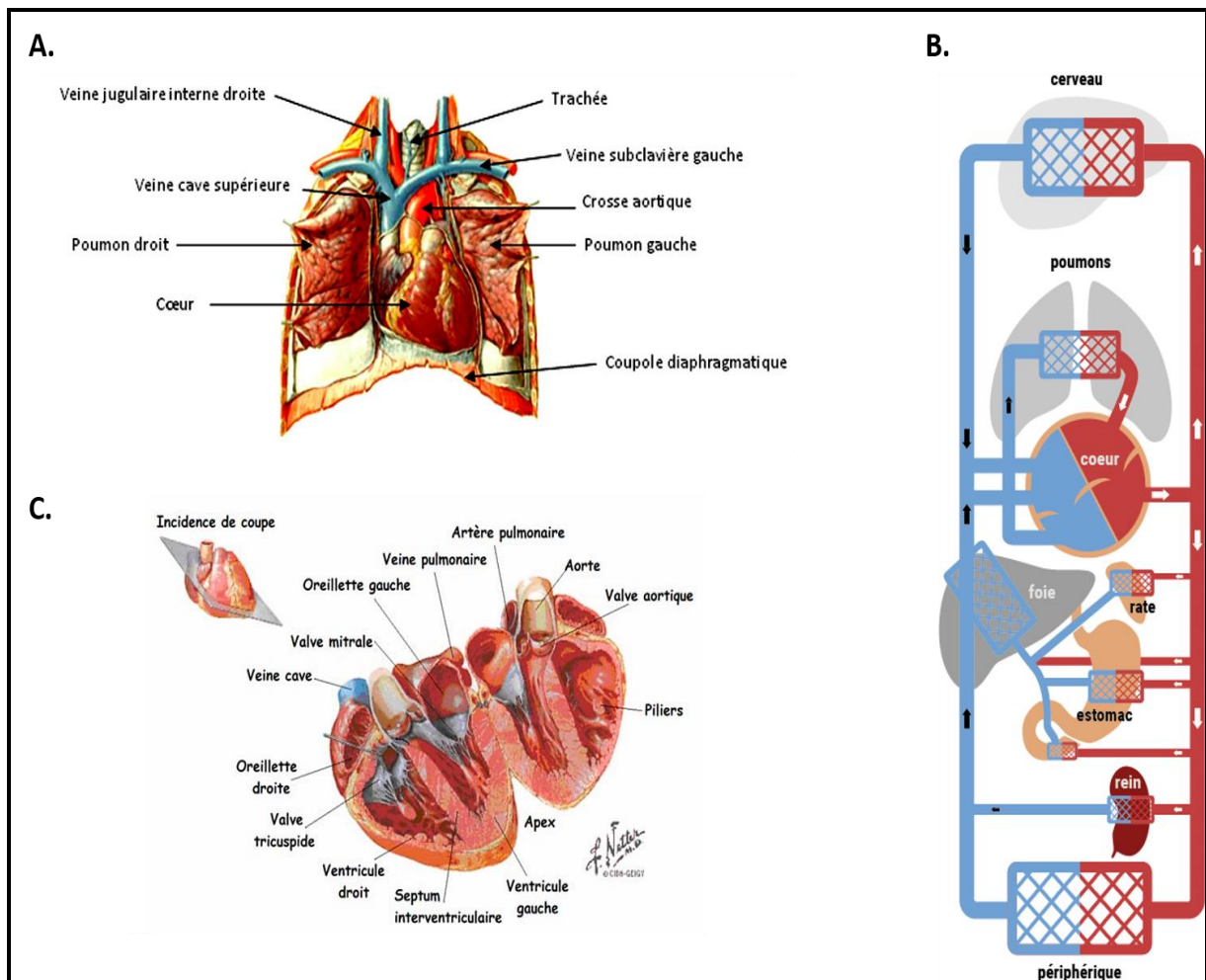
Cependant, l'oxygénation du sang n'était pas encore connue, même si Harvey avait déjà remarqué une différence de couleur entre le sang artériel rouge vif, et le sang veineux bleu sombre. C'est finalement Richard Lower, dans son traité de cardiologie « *Tractatus de Corde, item de motu et colore sanguinis, et chyli in eum tranfitu* » publié en 1669, qui évoque une possible oxygénation du sang. Il récupéra du sang veineux dans un flacon ouvert, le secoua et observa un changement de couleur du sang virant au rouge vif. Il est notable que les médecins de cette époque ne soupçonnaient pas le rôle de distribution du dioxygène par le système sanguin.

## 1.1.2 Anatomie et physiologie cardio-vasculaire

### 1.1.2.1 Le cœur et la circulation sanguine

Organe situé dans le médiastin antérieur, le cœur permet la bonne circulation du sang dans l'intégralité de l'organisme (Figure 2.A). Il est ainsi scindé en deux parties : le cœur droit et le cœur gauche, dont les ventricules sont séparés par un septum interventriculaire, faisant que le sang du cœur droit et du cœur gauche n'entrent jamais en contact. Le sang provenant des poumons par les veines pulmonaires (au nombre de 4) après inspiration circule vers le cœur en état oxygéné. Celui-ci se déverse dans l'oreillette gauche puis dans le ventricule gauche par la valve mitrale. La phase de remplissage s'effectue dans le ventricule (diastole) puis le muscle cardiaque se contracte (systole) pour éjecter le sang vers l'aorte au travers de la valve aortique pour distribuer le sang oxygéné dans les tissus (Figure 2.C). Le sang riche en oxygène va donc alimenter les différents organes de l'organisme, par le biais des artères. Celles-ci peuvent avoir différentes tailles selon l'emplacement dans le corps (tronc aortique  $\varnothing$  25mm ; artérioles  $\varnothing$  2mm, selon la Fédération Française de Cardiologie). Les artères s'affinent donc à l'approche des organes et forment un réseau capillaire conjointement avec les veines. Ainsi, les artères déversent l'oxygène ( $O_2$ ) et les nutriments dans les organes, puis les veines récupèrent les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) (Figure 2.B)

Le sang désoxygéné remonte alors par la veine cave inférieure (pour les organes digestifs, membres inférieurs) et la veine cave supérieure (pour les membres supérieurs, poumons, tête) et se déverse dans l'oreillette droite. Celle-ci transmet le sang au ventricule droit par la valve tricuspide, qui envoie le sang désoxygéné aux poumons grâce aux artères pulmonaires (au nombre de 2) via la valve pulmonaire (Figure 2.C). Il est intéressant de constater que dans les mœurs, les artères étaient caractérisées comme véhiculant le sang riche en  $O_2$ , et les veines le sang riche en  $CO_2$ . Or, la circulation pulmonaire en fait exception puisque les veines acheminent le sang riche en  $O_2$  vers le cœur, alors que les artères acheminent le sang riche en  $CO_2$  vers les poumons. Celles-ci définissent donc la petite circulation proposée par William Harvey dans son traité publié en 1628. Par la suite, les artères seront caractérisées comme quittant le cœur, et les veines rejoignant le cœur.



**Figure 2 : Anatomie cardiaque et circulations pulmonaire et systémique.** (A.) Dessin anatomique de thorax issu de l'atlas d'anatomie humaine de Franck Netter. (B.) Représentation schématique de la circulation sanguine dans le corps humain, proposé par la Fédération Française de Cardiologie. (C.) Dessin anatomique de coupe de cœur, issu de l'atlas d'anatomie humaine de Franck Netter.

### 1.1.3 Anatomie cardiaque et fonctionnement

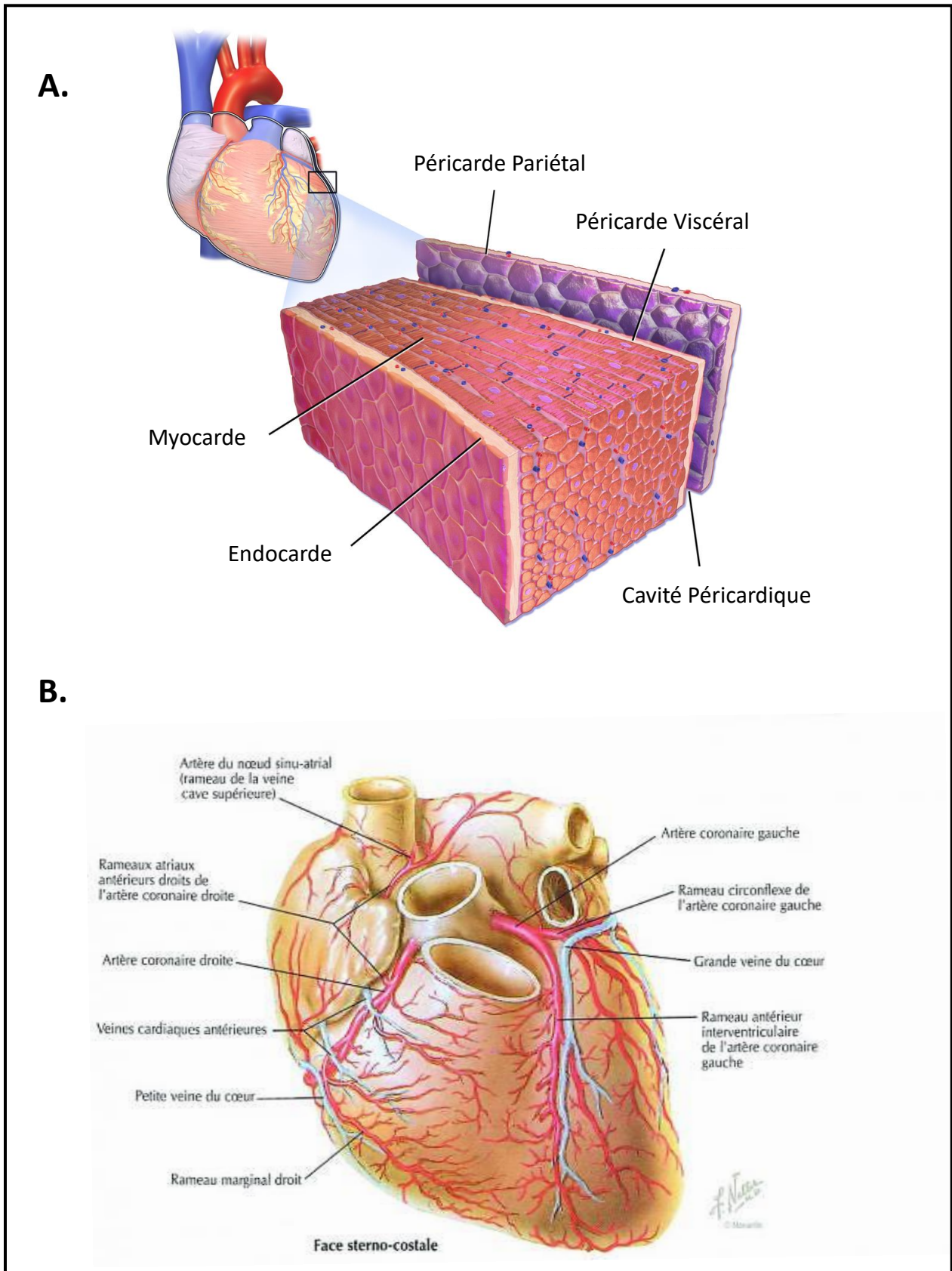
#### 1.1.3.1 Anatomie du cœur

Le cœur est composé de différentes couches de tissus. Il comprend dans sa partie interne l'endocarde, composé d'un endothélium (épithélium de type pavimenteux) semblable à celui tapissant les veines et les artères, également en lien continu avec celui des veines caves, pulmonaires, l'aorte et les artères pulmonaires (Figure 3.A). Il tapisse ainsi toute la partie interne des ventricules et des oreillettes, tissu vascularisé en lien avec les ramifications du tissu cardio-connecteur comme le réseau de Purkinje.

La partie médiane du cœur est constituée du myocarde. Celle-ci est constituée de cardiomyocytes, effectuant la force contractile du muscle. Il est intéressant de noter que ces cellules sont les moins renouvelées du corps humain. En effet, à 25 ans, seulement 1% des cardiomyocytes sont renouvelés sur une année (par exemple, les cellules rétinienne se renouvellent tous les 10 jours), ce pourcentage diminuant avec l'âge. Il n'a pas encore été mis en évidence l'existence d'un pool cellulaire souche permettant la réjuvenation du cœur, ainsi on considère que lors d'une vie complète d'un individu, moins de 50% du cœur a été renouvelé par division des cardiomyocytes (Parmacek & Epstein, 2009). On retrouve également dans le myocarde des vaisseaux coronaires, ainsi que de nombreuses fibres nerveuses permettant la contraction synchrone des fibres musculaires. On notera que les ventricules sont très musclés, contrairement aux oreillettes qui possèdent peu de cardiomyocytes.

La dernière partie est le péricarde, partie externe du cœur. Celui-ci est composé du péricarde séreux et du péricarde fibreux. Le péricarde séreux est constitué d'un sac à double paroi, comprenant le feuillet viscéral (entourant le cœur et la partie basale des vaisseaux), un espace virtuel contenant du fluide péricardique (permettant les mouvements du cœur par rapport à son environnement) et un feuillet pariétal pour protéger le cœur en surface. Il existe aussi un péricarde fibreux, qui est principalement constitué de ligaments permettant de fixer le cœur dans son environnement, en le liant au sternum, au diaphragme, et aux vertèbres (Figure 3.A).

Comme tout organe, le cœur a besoin d'être vascularisé pour fonctionner. Il est ainsi alimenté par la circulation systémique au travers des vaisseaux coronaires. Les artères coronaires partent directement de la partie basale de l'aorte, et alimentent le cœur en  $O_2$ . Des veines coronaires prennent ensuite en charge d'évacuer vers l'oreillette droite le sang enrichi en  $CO_2$ . Cependant il n'existe que peu d'anastomoses pour les vaisseaux coronariens. Ceci peut alors provoquer un risque en cas de pathologies obstructives des vaisseaux comme l'athérosclérose qui apparaît souvent dans les artères coronaires, induisant alors une ischémie cardiaque (déficit en dioxygène) provoquant la nécrose des tissus et donc un infarctus du myocarde. Ceci est alors très néfaste voire mortel en regard de la faible régénération du tissu myocardique (Figure 3.B)



**Figure 3 : Anatomie cardiaque et histologique du cœur.** (A.) Dessin représentatif de l'histologie cardiaque, issu de la galerie médicale du Blausen Medical, 2014. (B.) Dessin des vaisseaux coronariens du cœur, issu de l'atlas d'anatomie humaine de Franck Netter.

### 1.1.3.2 Cycle cardiaque : contraction et potentiel d'action

Il existe dans le cœur différents nœuds nerveux permettant l'activité cardiaque. Le courant électrique prend genèse dans le nœud sinusal, et se propage à l'ensemble du cœur. Dans un premier temps, le flux électrique va atteindre les oreillettes jusqu'à leur base et provoquer leur contraction. Ensuite, le flux électrique va converger vers le nœud auriculo-ventriculaire se situant entre les oreillettes et les ventricules. A partir de là, le flux va se répartir le long du septum interventriculaire et des ventricules le long du faisceau de His puis atteindre le réseau de Purkinje et déclencher la contraction ventriculaire. Les cellules du nœud sinusal provoquent ainsi un rythme automatique, appelé rythme sinusal, permettant au cœur de réguler son activité selon les besoins de l'organisme (Figure 4.A).

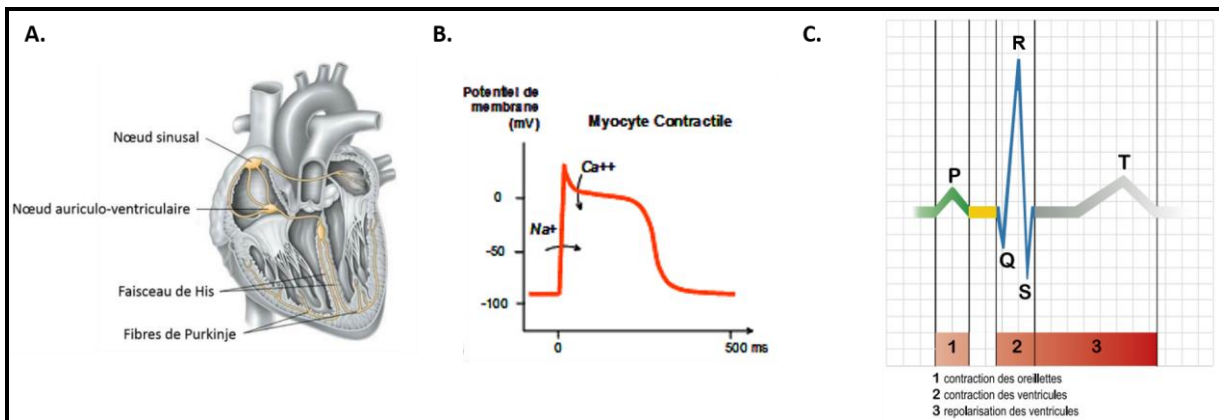
L'activité contractile du cœur est due au myocarde, plus précisément les cardiomyocytes. Ces derniers sont dits polarisés, ils ont une prédominance d'ions chargés négativement à l'intérieur de la cellule par rapport à l'extérieur. On parle alors d'un potentiel de repos, ici correspondant à un différentiel de charge de l'ordre de  $-90\text{mV}$  entre le milieu intérieur et extérieur de la cellule. Un cardiomyocyte est une cellule excitable. Son excitation par les nœuds nerveux déclenche un potentiel d'action à l'origine de la contraction cardiaque, et se décompose en 4 phases (Figure 4.B).

- Phase 0 : Ouverture des canaux sodiques ( $\text{Na}^+$ ) permettant l'influx de sodium dans les cardiomyocytes, élevant le potentiel d'action jusqu'à  $+20\text{mV}$ . Ce phénomène est très rapide. Le potentiel d'action ne se déclenche qu'une fois une valeur seuil atteinte (environ  $-50\text{mV}$ ).
- Phase 1 : Début de fermeture des canaux sodiques et calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ , plus lents) pour repolariser les cellules et début d'ouverture des canaux potassiques ( $\text{K}^+$ ) pour chasser le  $\text{K}^+$  intracellulaire.
- Phase 2 : état stable entre entrée des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et la sortie des ions  $\text{K}^+$  donnant un plateau.
- Phase 3 : Repolarisation de la membrane par fermeture complète des canaux  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  et efflux des ions  $\text{K}^+$ .

- Phase 4 : retour à l'état de repos, aux alentours de -90mV. Le potentiel de repos est maintenu négatif grâce aux pompes Na/K-ATP dépendantes qui régulent l'équilibre ionique membranaire.

La transmission du flux électrique entre cardiomyocytes est facilitée par la présence de disques intercalaires permettant une jonction communicante entre les cellules et accélérant la propagation du flux électrique, à la fois dans le plan vertical et horizontal. Ainsi on observe un effet pulsatile du flux à travers le cœur et une synchronisation contractile des cardiomyocytes.

En mesurant les différents potentiels d'action des muscles cardiaques et des différents nœuds nerveux, on peut élaborer un électrocardiogramme (ECG), sur lequel on distingue l'onde P (dépolarisation et contraction des oreillettes droites et gauches), l'onde QRS (dépolarisation et contraction des ventricules droits et gauches), et enfin l'onde T (repolarisation et relaxation des ventricules) (Figure 3.C).



**Figure 4 : Fonctionnement du rythme cardiaque.** (A.) Dessin représentant les nœuds impliqués dans le rythme cardiaque, traduit de « Interactive physiology, cardiovascular system » de Marieb & Branstrom, 1996. (B.) Graphique représentatif d'un potentiel d'action type observé dans les cardiomyocytes, proposé par le service de cardiologie de l'université de Montpellier. (C.) Electrocardiogramme type présentant les différentes phases de contraction/relaxation des ventricules et oreillettes, issu de la Fédération Française de Cardiologie.

### 1.1.3.3 Artères, veines et capillaires

Les artères sont des vaisseaux emmenant le sang du cœur vers les organes. Ces vaisseaux sont très muscliculés, et en sortie de cœur subissent une pression forte due à la force de contraction inotrope provoquée par le ventricule gauche, se situant en moyenne à 125mmHg (millimètres de mercure) après systole, et à 70mmHg après diastole. Ainsi les

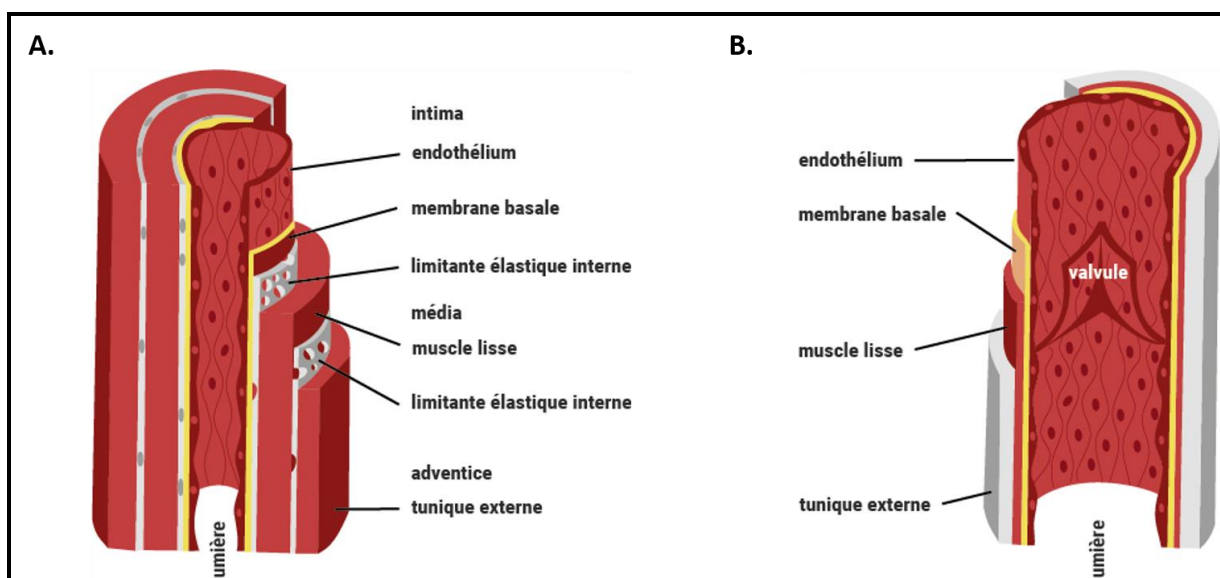
artères sont capables de moduler la pression artérielle grâce à 3 couches de tissus présentes sur celles-ci (Figure 5.A). On y trouve tout d'abord la partie externe, l'adventice, constituant la couche protectrice et également permettant de fixer les artères aux organes environnants et à un support (exemple de l'aorte thoracique le long des vertèbres). En partie médiane vient la media, constituant la partie tonique de l'artère. Principalement composée de cellules musculaires lisses, celle-ci peut ainsi se distendre ou se contracter afin de moduler le diamètre interne de l'artère et réguler la pression artérielle. Vient enfin l'intima, formant la partie interne de l'artère, véritable chef d'orchestre du tonus vasculaire. Celle-ci principalement formée d'une monocouche de cellules endothéliales dans sa partie la plus interne (au contact du sang) permet de diriger les cellules de muscles lisses. Dotées de mécanorécepteurs, les cellules endothéliales subissent une contrainte de cisaillement appliquée par le flux sanguin, appelée « Shear Stress », permettant de détecter le flux sanguin. Plus le « shear stress » augmente, plus la pression artérielle est élevée, ainsi les cellules endothéliales synthétisent des facteurs vasodilatateurs comme l'oxyde nitrique (NO) ou des prostacyclines qui agiront comme facteur relaxant sur les cellules de muscle lisse. Si le « shear stress » est trop faible, ceci symbolise une pression artérielle trop faible, ainsi les cellules endothéliales vont synthétiser des facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline pour rehausser la pression artérielle. Le système neuro-humoral peut également moduler le tonus vasculaire par le biais de neurotransmetteur comme l'acétylcholine ou l'adrénaline, dont l'effet peut varier selon l'état de repos de l'organisme ou pendant une activité physique, dans le but de moduler le tonus vasculaire afin de procurer aux organes les nutriments et l'oxygène nécessaires à l'activité en cours.

Les veines sont des vaisseaux emmenant le sang des organes périphériques vers le cœur. Au contraire des artères, ces vaisseaux sont peu musclicularisés et nécessitent ainsi une activité des muscles squelettiques afin d'effectuer le retour veineux vers le cœur (notamment dans les jambes). La structure des veines est plus simple que celle des artères. Néanmoins, elles possèdent des composants qui leur sont propres. On constate ainsi sur les veines la présence de valvules, formées par les cellules endothéliales, permettant d'éviter le reflux sanguin et de toujours garder une unidirectionnalité de la circulation sanguine (Figure 5.B). La diastole du ventricule droit aide également à l'aspiration du sang vers le cœur. Le retour



veineux doit d'ailleurs être suffisant pour assurer un remplissage du ventricule droit correct (pré-charge) et ainsi permettre une bonne circulation.

Les capillaires sanguins sont les vaisseaux les plus petits (diamètre entre 3 et 10 $\mu$ m) et possèdent une paroi très mince, constituée de cellules endothéliales reposant sur une lame basale. On distingue trois types de capillaires sanguins. Dans un premier temps, les capillaires continus, dans lesquels on y trouve des cellules endothéliales jointives et formant un endothélium ininterrompu. L'échange sanguin peut se faire par diffusion par les fentes intercellulaires, on en retrouve par exemple au niveau des muscles et des poumons. Ensuite, les capillaires fenestrés, dans lesquels les cellules endothéliales présentent des pores ou fenestrations (diamètre de 70nm), perméables aux liquides, que l'on trouve dans les organes à filtration importante comme le foie, l'intestin grêle, glandes endocrines, reins, etc. Ces fenestrations permettent la diffusion rapide des macromolécules. Enfin, les capillaires discontinus à grand diamètre (1-3 $\mu$ m) dont la membrane basale est discontinue voir inexistante comme dans le foie, la rate ou la moelle osseuse. Ceux-ci permettent le passage des éléments figurés du sang, à savoir les érythrocytes (hématies), les leucocytes et les plaquettes. La pression et le débit étant très faible dans les capillaires, la régulation de la pression artérielle est cruciale au maintien des capillaires mais aussi aux bons échanges en gaz et nutriments entre le sang et les organes.



**Figure 5 : Représentation schématique des vaisseaux sanguins. (A.) : Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'artère, avec les tissus qui la composent. (B.) Représentation schématique d'une coupe longitudinale de veine, avec les tissus qui la composent. Les deux schémas sont issus de la Fédération Française de Cardiologie.**

#### 1.1.4 Pathologies cardio-vasculaires et enjeux

Les maladies cardiovasculaires sont le principal fléau que subit l'être humain, première cause de mortalité dans le monde. Selon L'Organisation Mondiale de la Santé, on estime aujourd'hui environ 17.7 millions de décès dus aux maladies cardiovasculaires en une année (Mai 2017), soit 31% de la mortalité mondiale totale, dont 7.4 millions correspondant à des cardiopathies coronariennes et 6.7 millions aux accidents vasculaires cérébraux (AVC) (2015).

Cependant, la part génétique est très faible dans ces pathologies, et la majorité est donc environnementale. Ainsi, on constate une hausse de ces pathologies liée à la mauvaise hygiène de vie des patients. Des facteurs de risques les déclenchent, comme le tabagisme, une mauvaise alimentation pouvant provoquer une obésité, la sédentarité et la consommation d'alcool.

Ces facteurs sont notamment responsables d'occlusions vasculaires appelées thromboses. Parmi celles-ci on compte l'athérosclérose. La formation de plaques d'athérome se forme alors entre la couche endothéliale et la couche de cellules de muscle lisse. Un excès de LDL oxydé (Low Density Lipid, ou lipide à faible densité) présent dans le sang sera capté par les macrophages, qui se fixent sur l'endothélium et pénètrent entre les cellules endothéliales dans la paroi des artères. Elles vont s'y loger et devenir des « Foam Cells », cellules graisseuses stockant les LDL. En réponse à cela, les cellules de muscles lisses vont migrer autour de ces « Foam Cells » et proliférer, les cellules endothéliales vont sécréter de la matrice extracellulaire, ce qui va donner un manchon fibreux dans l'artère, au détriment de la lumière du vaisseau (le diamètre externe de l'artère ne varie pas). Ainsi, le diamètre interne se voit considérablement réduit limitant le flux sanguin. Dans un second temps, la plaque d'athérome peut se fragiliser, et ainsi libérer son contenu dans la lumière artérielle et venir provoquer une thrombose du vaisseau. Selon la localisation de cette plaque, on peut constater différentes formes anatomo-cliniques comme une angine de poitrine ou infarctus du myocarde (artères coronaires), un accident vasculaire cérébral (carotides ou polygone de Willis) claudication intermittente voire phlébite (dans les membres inférieurs), etc... Des traitements existent et se mettent en place pour traiter ces pathologies, comme limiter la fixation des macrophages à l'endothélium ou rendre les plaques d'athérome plus résistantes pour limiter leur rupture, même si corriger l'hygiène de vie reste la meilleure solution aujourd'hui.

Les pathologies héréditaires sont plus rares, mais peuvent être plus mortelles et nécessitent des traitements en plus de l'hygiène de vie. On y trouve des cardiopathies congénitales provoquant la plupart du temps des arythmies sévères, également parfois une hypertension artérielle et encore des insuffisances cardiaques dues à une dyspnée myocardique. Ainsi les traitements visent à corriger la tension artérielle, réguler l'arythmie et également reprendre une activité physique régulière. Dans les cas les plus sévères, la chirurgie est parfois nécessaire voire jusqu'à la transplantation cardiaque. Il existe parmi ces maladies génétiques des pathologies plus rares, comme l'Hypertension Artérielle Pulmonaire, pour laquelle aucun traitement n'existe à ce jour, et le pronostic vital est très faible puisque le décès des patients survient peu de temps après diagnostic (pathologie que je détaillerai ultérieurement).

#### 1.1.5 Malformations veineuses et artério-veineuses (MAV)

Les anomalies vasculaires sont des lésions localisées des vaisseaux sanguins dues à des anomalies au cours de l'angiogenèse. Sur la base de critères biologiques et cliniques, ils peuvent être divisés en tumeurs vasculaires et malformations vasculaires. Alors que les hémangiomes représentent la majorité des tumeurs vasculaires, les malformations vasculaires comprennent les malformations veineuses, capillaires, artérielles, lymphatiques et combinées. Ces lésions peuvent soit causer des dommages esthétiques limités, soit être une préoccupation médicale majeure en raison de la douleur, du saignement et de la destruction des tissus. Bien que les petites lésions puissent souvent être bien traitées, les thérapies sont limitées pour les lésions compliquées, nécessitant le développement de nouvelles approches. Aujourd'hui, des médicaments anti-angiogéniques sont testés pour certaines anomalies vasculaires (Uebelhoer, 2012).

##### 1.1.5.1 Hémangiomes Infantiles

Les hémangiomes infantiles (HI) sont les tumeurs bénignes les plus courantes de la petite enfance, apparaissant chez environ 10% des nouveau-nés en Europe. Les HI affectent les femmes plus fréquemment que les hommes, selon un ratio de 3 contre 1. On les trouve principalement à la tête et au cou (60%) et concernent principalement la peau et les tissus sous-cutanés (Boscolo & Bischoff, 2009). Les hémangiomes infantiles sont caractérisés par une

phase de prolifération avec une augmentation rapide de la taille de la tumeur jusqu'à l'âge de 6 à 12 mois, suivie d'une phase involutive au cours de laquelle les HI régressent spontanément et disparaissent finalement vers l'âge de 5 à 10 ans. La phase de prolifération est caractérisée histologiquement par la présence de petits canaux vasculaires composés d'agrégats clonaux de cellules endothéliales (CE) mélangés à des péricytes, des cellules dendritiques et d'un nombre élevé de mastocytes. La théorie de la néogenèse endothéliale est étayée par l'expression de facteurs angiogéniques et leurs récepteurs : facteur de croissance endothélial vasculaire A (VEGF-A), récepteurs du VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2, facteur de croissance de fibroblaste basique (bFGF), TIE2 et angiopoïétine -2 (ANGPT2) (Boscolo & Bischoff 2009). Les traitements actuels de l'HI reposent sur les antagonistes des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, le propranolol ou l'acébutolol, ainsi que sur les corticostéroïdes. Les  $\beta$ -bloquants pourraient agir en dérégulant ces facteurs angiogéniques, tels que le VEGF et le bFGF, et en promouvant l'apoptose des cellules capillaires (Leaute-Labreze, 2008).

#### 1.1.5.2 Malformations veineuses (MV)

Avec une incidence estimée entre 1/5000 et 1/10 000, les anomalies veineuses font partie des anomalies vasculaires les plus fréquentes référées par des centres spécialisés en raison de la morbidité. Les deux principales sous-classes sont les malformations veineuses muco-cutanées (VMCM; MIM 600195), représentant environ 95% des anomalies veineuses, et les malformations glomuveineuses (GVM; MIM 138000), représentant la majorité des 5% restants (Uebelhoer, 2012). Certains syndromes incluent également des anomalies veineuses, telles que le syndrome « Blue Rubber Bleb Nevus » (BRBN; MIM112200), Le syndrome Klippel – Trénaunay (KT; MIM 149000) et le syndrome Maffucci (MS; MIM 166000), dus à des mutations gains de fonction de TIE2. Principalement sporadique (98%), la MV peut plus rarement être héréditaire. Les MV sont des lésions molles, compressibles, bleues claires à foncées, qui se développent principalement sur la peau et les muqueuses et infiltrent souvent les tissus, les muscles et les articulations sous-jacentes (Domp martin, 2010). Histologiquement, les MV sont caractérisées par des canaux élargis recouverts d'une couche unique de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses vasculaires irrégulières (Vikkula, 1996). Les formes rares héréditaires sont médiées par des mutations spécifiques gain de fonction aux cellules endothéliales du Récepteur Tyrosine Kinase TIE2/TEK. Trois ligands connus se lient à TIE2: l'angiopoïétine 1 (ANGPT1), l'angiopoïétine 2 (ANGPT2) et

l'angiopoïétine 4 (ANGPT4). Alors que ANGPT1 active la phosphorylation de TIE2, ANGPT2 est considéré comme un modulateur de l'activité de TIE2 dépendant du contexte. Lors de la liaison du ligand, les récepteurs TIE2 se dimérisent et se phosphorylent de manière croisée, ce qui entraîne l'activation des voies PI3K/Akt (dont le gène *PIK3CA* peut aussi présenter des mutations gain de fonction MIM 171834) et MAPK, qui activent la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que la formation et la germination de tubes vasculaires (Uebelhoer, 2012). Le traitement actuel des MV repose sur la destruction de la lumière des vaisseaux anormaux par la sclérothérapie (avec de l'alcool ou d'autres agents toxiques pour l'endothélium) ou par son élimination chirurgicale. En fonction de la localisation anatomique, les deux approches peuvent être d'une utilité limitée et une repousse est souvent observée. Par conséquent, il y a un besoin urgent de meilleurs traitements. Le Sirolimus (Rapamycine) est actuellement en phase 3 d'essai clinique (EudraCT Number : 2015-001703-32) procurant des améliorations chez 39 patients sur 43 tant sur la réduction de la douleur que sur la réduction des malformations veineuses avec un taux de 89%. Le Sirolimus agit ainsi sur la voie TIE2 en inhibant l'activité de mTOR, lui-même activé par la voie PI3K/Akt (figure 6) (Seront, 2019).

#### 1.1.5.3 Malformations capillaires (MC)

Une sous-entité distincte de malformations capillaires sont les MC associées à une malformation artério-veineuse (CM-AVM; MIM 608354), caractérisées par de petites MC multifocales rouges ou brunâtres, souvent entourées d'un halo pâle. Ces MC sont souvent associées à une lésion à écoulement rapide (30%), telle qu'une fistule artérioveineuse (FAV), une MAV ou un syndrome de Parkes Weber (PKWS) (Revencu, 2008a). La transmission autosomique dominante a permis d'identifier le gène responsable, *RASA1* (Eerola, 2003). La protéine codée, p120RasGAP, régule négativement la voie Ras/MAPK. Après l'activation, p120RasGAP est recruté à la membrane de la cellule (seule ou avec l'annexine A6), où il inactive Ras en renforçant son activité GTPase, générant une Ras inactive liée à GDP (Grewal, 2005). Ainsi une mutation de p120RasGAP permet le maintien de la voie Ras/MAPK permettant alors la prolifération, survie et migration des cellules endothéliales (Uebelhoer, 2012) (Figure 6).

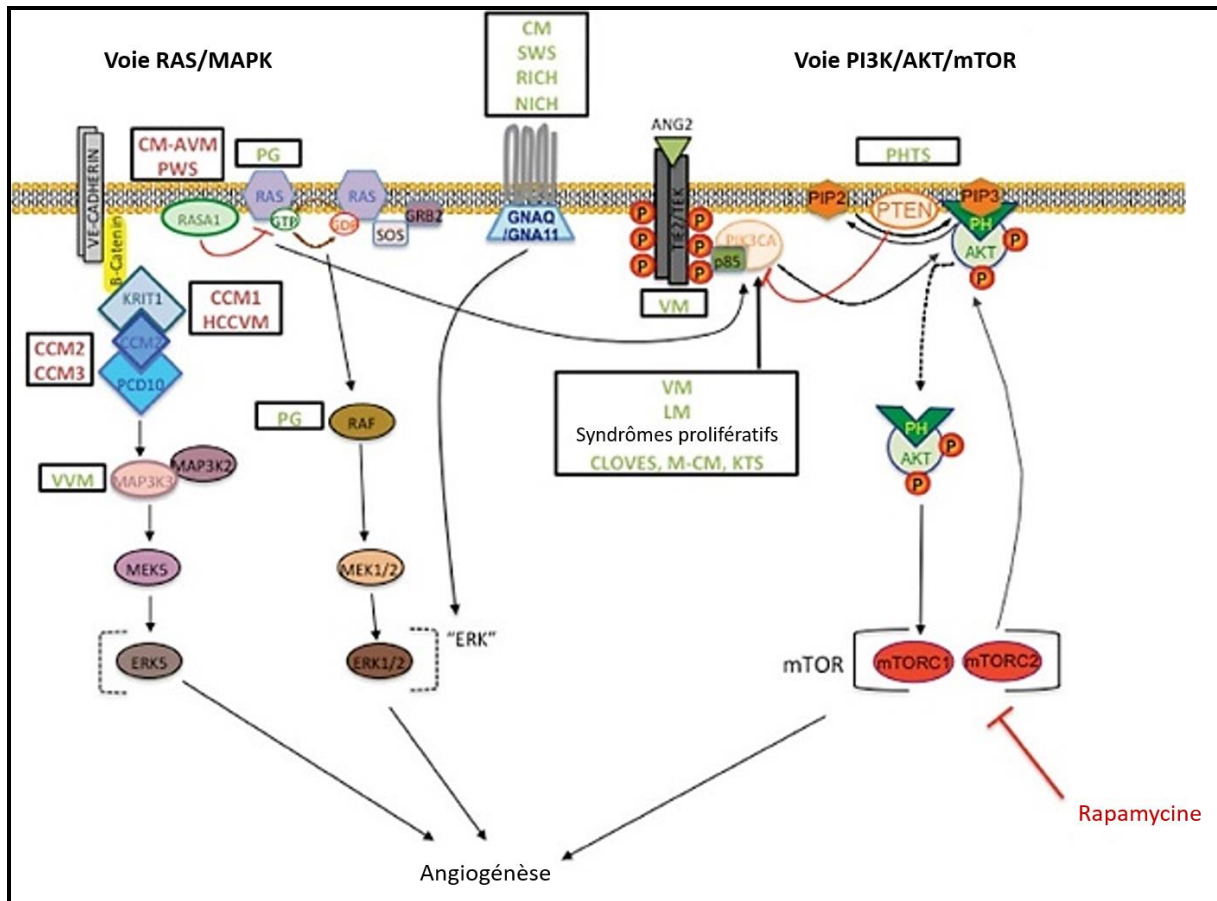
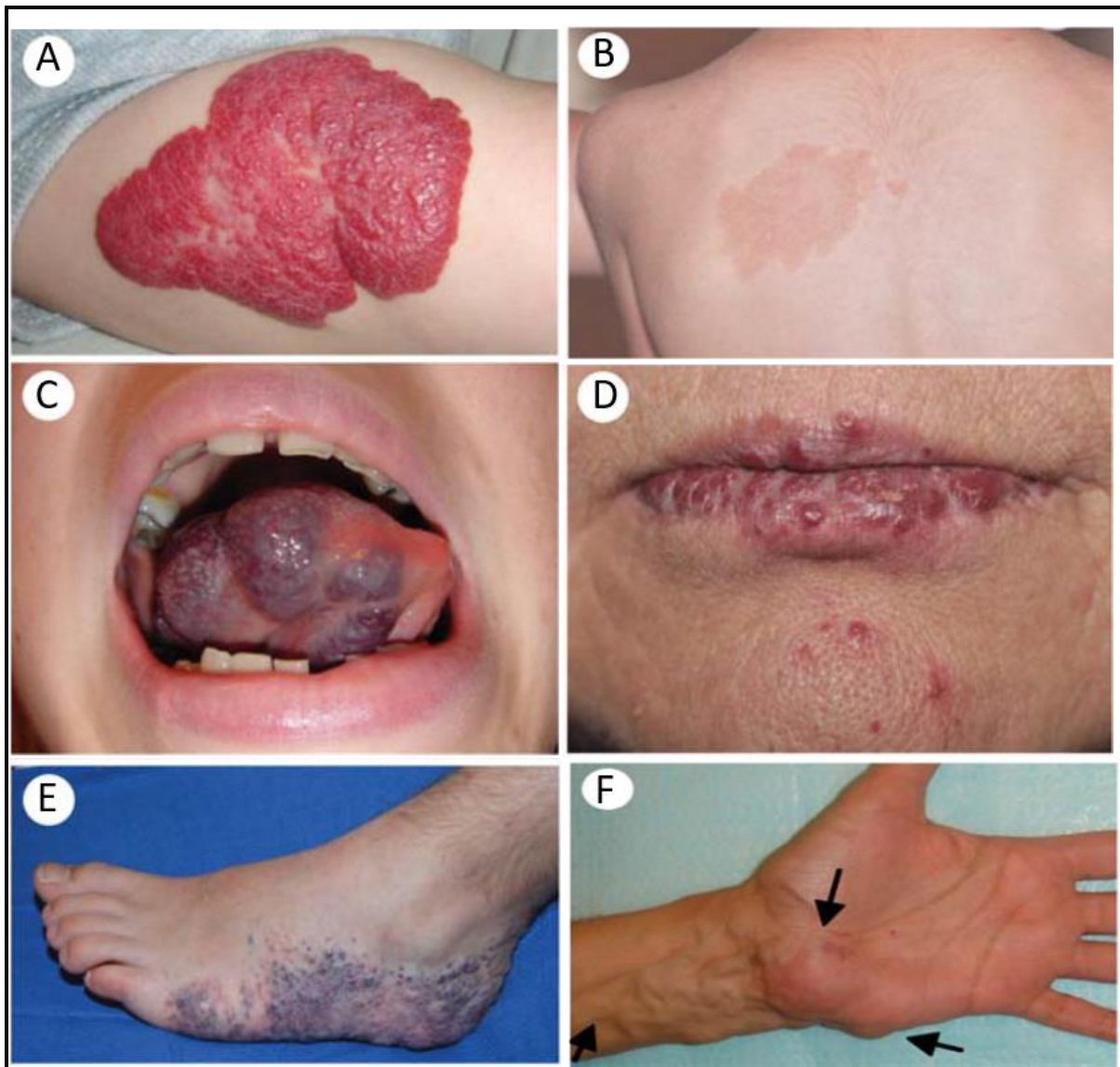


Figure 6 : Schéma représentant les voies de signalisations impliquées dans les formes héréditaires des malformations veineuses (traduit de Nguyen, Boon & Vikkula, 2017).

Parmi les malformations capillaires on trouve les malformations cérébrales cavernueuses (CCM) (MCM; MIM 116860), qui surviennent chez environ 0,5% de la population. Elles sont principalement sporadiques (80%) mais peuvent se présenter sous forme héréditaire à dominance autosomique (20%). Les patients ont souvent des convulsions, des maux de tête, des problèmes neurologiques et des hémorragies cérébrales, bien que certains soient asymptomatiques. Les lésions sont principalement localisées dans le cerveau, mais également dans la moelle épinière et la rétine, et sont parfois accompagnées de lésions vasculaires cutanées. Bien que les patients sporadiques ne présentent généralement qu'une seule lésion, les CCM familiales se caractérisent par des lésions multifocales. Celles-ci sont dues à des mutations bien connues. La forme CCM1 dues à des mutations de *KRIT1*, CCM2 due à des mutations de *malcavernin* (ou CCM2), CCM3 due à des mutations de *PDCD10*, et enfin CCM4 dont la mutation reste inconnue, sur le locus 3q26.3-27.2. Toutes ces mutations affectent alors la voie des intégrines et p38/MAPK. Histologiquement, les CCM sont constituées de vaisseaux capillaires dilatés entourés d'une couche défectueuse de cellules

endothéliales sans jonctions serrées, ce qui entraîne des lacunes entre ces cellules (Revenu & Vikkula, 2006). Des traitements sont actuellement en cours d'investigation grâce aux criblages à haut débit permettant de proposer de nouvelles molécules originales repositionnées dans cette pathologie, et apportant de nettes améliorations signalétiques et également phénotypiques tant sur les modèles cellulaires comme HMVECd et HUVEC (retour d'un phénotype allongé à normal), mais également sur les CCM présentes sur les cervelets de souris (réduction des saignements) (Gibson, 2015 ; Otten, 2018).

Enfin, on trouve parmi ces malformations les Télangiectasies Hémorragiques Héritaires (HHT ; MIM 187300) ou Maladie de Rendu-Osler. Il s'agit d'une maladie héréditaire à dominance autosomique avec une incidence de 1/5000 à 1/8000 dans le monde. Elle se caractérise par des télangiectasies cutanéomuqueuses et gastro-intestinales, souvent associées à de multiples MAVs (Malformations artério-veineuses) ou FAVs (Fistules artério-veineuses) dans les poumons, le foie, le cerveau ou le tractus gastro-intestinal. Les télangiectasies sont des dilatations focales de veinules post-capillaires, entourées de vastes couches de cellules de muscle lisse, avec des connexions directes aux artérioles dilatées en l'absence d'un lit capillaire intermédiaire. Les patients souffrent alors d'épistaxis (saignement nasale) récurrent et important (Govani & Shovlin 2009). Cette pathologie étant l'une des deux que j'ai étudié au cours de ma thèse, je dédierai un paragraphe à celle-ci plus loin dans l'introduction (Partie 3.1).



**Figure 7: Photographies d'anomalies vasculaires chez des patients. (A.) : Hémangiomes sur l'avant-bras. (B.) : Malformations capillaires (MC) sous forme CM-AVM dans le dos. (C.) : Malformations veineuses (MV) sur la langue. (D.) : Télangiectasies hémorragiques héréditaires (HHT) sur les lèvres. (E.) : Malformations glomuveineuses (GVM) sur le pied. (F.) : Malformations artérioveineuses (AVM) sur la main. (Adapté de Uebelhoer et al., 2012).**



## 1.2 Introduction au système pulmonaire et respiratoire

### 1.2.1 Historique de la respiration : travaux de Lavoisier et Laplace

Antoine Laurent Lavoisier est un chimiste, économiste, biologiste, physicien, avocat et astronome français, né à Paris en 1743 et mort décapité à Paris en 1794 Place de la Révolution pendant la période de la Terreur lors de la Révolution Française. On lui doit entre autres « Le Traité Élémentaire de Chimie » (1789) remettant en cause les fondements de la chimie phlogistique, notamment avec la loi de conservation de masse, utilisée encore aujourd'hui. Ses travaux de chimiste lui ont également permis d'identifier les gaz présents dans l'atmosphère et de caractériser la respiration animale, soumis en 1777 dans « Expériences sur la respiration des animaux et dans les changements qui arrivent à l'air en passant par leurs poumons », publié comme mémoire à l'Académie Royale des Sciences.

Ainsi grâce à l'élaboration de ses propres instruments de mesures, il put identifier la composition en gaz de l'atmosphère, et notamment le gaz permettant à tout animal de respirer. Les dogmes de l'époque comprenaient que la respiration était nécessaire à la vie animale, mais décrivaient cet air nécessaire comme l'air « phlogistique », élément flamme proposé J.J Becher au cours du XVIIe siècle. Lavoisier viendra bouleverser ces croyances par l'expérience suivante :

*« J'ai placé un moineau franc sous une cloche remplie d'air commun et plongé dans une jatte pleine de mercure. L'animal n'a paru nullement affecté pendant les premiers instants, il était seulement assoupi. Au bout d'un quart d'heure, il a commencé à s'agiter, sa respiration est devenue pénible et précipitée. Au bout de 55 minutes, l'animal est mort avec des espèces de mouvements convulsifs. Cet air, qui avait été respiré par un animal était devenu fort différent de l'air de l'atmosphère. Il précipitait l'eau de chaux (déjà identifié comme CO<sub>2</sub>) et éteignait les lumières » (Figure 8.A).*

Lavoisier remarque par ailleurs une similarité entre le gaz émis par la respiration et par la combustion. Il en déduit alors que l'organisme vivant combure l'air atmosphérique dans les poumons, pour en retour produire du CO<sub>2</sub>. Il poursuit ses travaux grâce à Pierre Simon Laplace, un jeune mathématicien, astronome, physicien et homme politique normand dont Lavoisier apprécie tout particulièrement la rigueur scientifique. Ils introduisent un cochon d'Inde dans

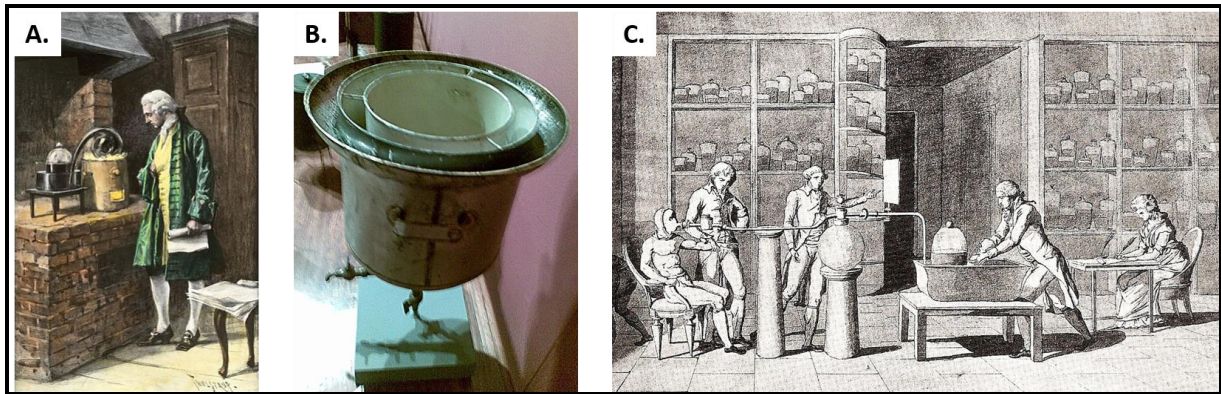
un calorimètre qu'ils ont mis au point (Figure 8.B), et quantifient la chaleur dégagée par l'animal en mesurant l'eau produite par la glace fondue, et mesurent aussi l'oxygène consommée. Ils font de même avec du charbon qui brûle. Ils remarquent ainsi une corrélation entre chaleur produite et oxygène consommé, qu'ils étaient en mesure de peser grâce à une balance dédiée aux gaz que Lavoisier mit lui-même au point.

Ils en tirent ainsi l'observation suivante :

*« La respiration est donc une combustion, à la vérité fort lente. Mais d'ailleurs parfaitement semblable à celle du charbon. Elle se fait dans l'intérieur des poumons sans dégager de lumière sensible, parce que la matière du feu devenue libre est aussitôt absorbée par l'humidité de ses organes. La chaleur développée dans cette combustion se communique au sang qui traverse les poumons et de là, se répand dans tout le système animal ».*

On constate que Lavoisier et Laplace se trompent quant au lieu de « combustion » du dioxygène, puisque celui-ci se fait dans les organes et non dans les poumons, ces derniers étant juste un vecteur de transmission pour les échanges gazeux entre l'air extérieur et le sang. Néanmoins, ils identifient parfaitement le concept de respiration, en prouvant une consommation de dioxygène par les animaux et un rejet de dioxyde de carbone.

Ses travaux se poursuivirent avec Armand Seguin, un chimiste et médecin français, en mettant au point un « respiromètre » (Figure 8.C). Seguin fit office de cobaye pour cette expérience (première expérience de Lavoisier sur un être humain), et Lavoisier pu alors démontrer que les besoins en dioxygène variaient selon l'activité physique de l'individu. Ces travaux constituaient ainsi la base de la physiologie respiratoire telle que nous la connaissons aujourd'hui. Il est intéressant de noter que contrairement aux travaux de William Harvey et ses prédécesseurs, Lavoisier a travaillé comme un réel chimiste plutôt que physiologiste, sans effectuer de dissections sur animaux ou être humain.



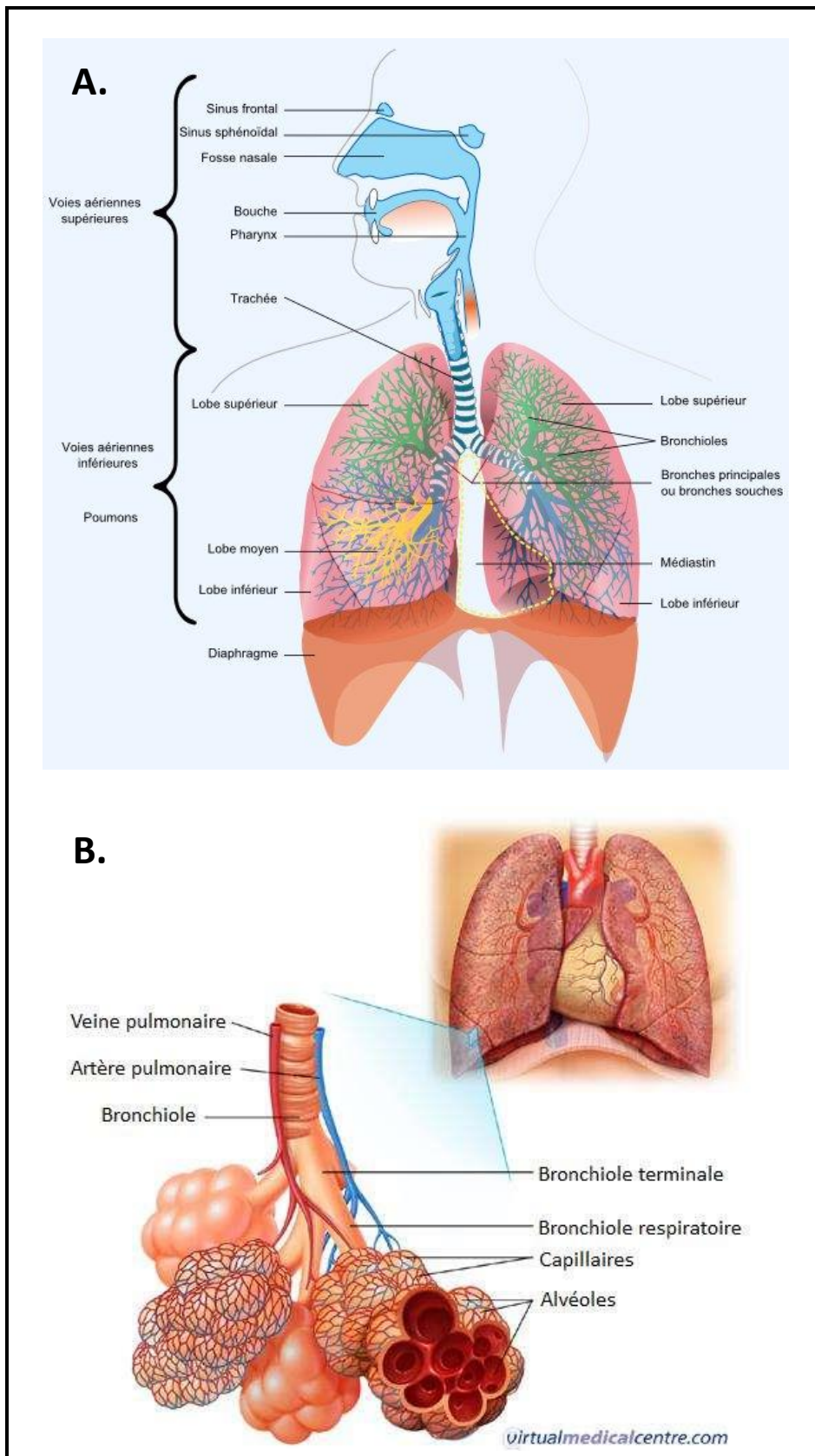
**Figure 8 : Expériences d'Antoine Laurent Lavoisier.** (A.) Dessin montrant le principe de l'expérience du moineau de Lavoisier. Ici, il montre également que la combustion du Mercure consomme du dioxygène. (B.) Calorimètre mis au point par Lavoisier et Laplace, avec en son centre un emplacement pour y mettre un cobaye, puis dans le cercle autour de la glace. Photo issue de la collection des instruments historiques de l'Institut de l'Education Secondaire Jorge Manrique (Palencia, Espagne). (C.) Dessin présentant l'expérience de Lavoisier et Seguin sur le « respiromètre ». On y trouve tout à gauche Armand Seguin en cobaye, tout à droite Marie Anne Lavoisier en greffière, et à sa gauche Antoine Lavoisier. La présence de Laplace n'est pas confirmée dans cette peinture, réalisée par Marie Anne Lavoisier qui s'occupait de toutes les illustrations de son époux (issu du *Traité Élémentaire de Chimie*, 1789).

### 1.2.2 Anatomie pulmonaire et fonctionnement

Situés dans la cage thoracique, les poumons ont pour fonction principale d'apporter à l'organisme du dioxygène et d'éliminer le dioxyde de carbone produit dans les organes. Les poumons sont au nombre de 2 et constitués de lobes. Le poumon droit est composé de 3 lobes, alors que le gauche uniquement de 2, notamment parce qu'une partie de l'espace est occupée par le cœur. Le poumon possède en sa face extérieure une plèvre pulmonaire, feuillet protégeant la surface du poumon, en continuité avec la plèvre pariétale, qui tapisse la partie interne de la cage thoracique. Entre ces deux plèvres se trouve la cavité pleurale, contenant un liquide séreux permettant aux poumons de glisser sur la surface thoracique (Figure 9.A).

Lors de la respiration, le dioxygène passe alors par les voies nasales, se réchauffe et se filtre dans les choanes dans l'arrière nez, puis passe dans le pharynx et le larynx, descend dans la trachée pour atteindre finalement les bronches pulmonaires (Figure 9.B). Celles-ci se divisent ensuite en bronchioles, pour se terminer par des alvéoles où s'effectuera l'échange gazeux avec le sang. Un réseau capillaire tapisse la paroi des alvéoles pour permettre l'absorption du dioxygène et l'expulsion du dioxyde de carbone. On compte dans les poumons environ 600 à 800 millions d'alvéoles, permettant ainsi avec les capillaires de constituer une

surface d'échange de pas moins de  $100\text{m}^2$ . Ainsi, le sang riche en  $\text{CO}_2$  provenant du ventricule droit passe par les artères pulmonaires jusque dans les poumons et déverse le  $\text{CO}_2$  dans les alvéoles, puis l' $\text{O}_2$  passe des alvéoles au sang, pour ensuite rejoindre les veines pulmonaires et enfin le ventricule gauche.



**Figure 9 Anatomie fonctionnelle des poumons et voies respiratoires.** (A.) Représentation schématique des voies respiratoires supérieures et inférieures, issue du site internet V.L.C Research OPHYS. (B.) Dessin illustrant l'agencement bronchial et alvéolaire dans les poumons, avec le réseau capillaire le tapissant permettant l'échange gazeux, issu du site internet Virtual Medical Centre.

### 1.2.3 Mécanisme de la respiration : Respiration, Pression partielle gazeuse et pH sanguin

#### 1.2.3.1 La respiration anatomique

La respiration est un mécanisme impliquant différents acteurs, et se décompose en 2 parties distinctes.

Dans un premier temps, l'inspiration. Lorsque l'on inspire, plusieurs muscles se contractent afin de créer une dépression intra-thoracique permettant l'entrée de l'air dans les poumons. Des muscles permettent d'effectuer ce mouvement, on compte notamment le diaphragme qui permet d'abaisser le plancher pulmonaire et les muscles intercostaux externes qui permettent d'étendre la cage thoracique latéralement. Lorsque ces mouvements sont insuffisants, d'autres muscles dits accessoires peuvent aider à augmenter l'amplitude inspiratoire comme les muscles scalènes et sterno-cléido-mastoïdiens (cou) ou encore le trapèze (épaule) pour étirer la cage thoracique vers le haut. L'utilisation intempestive de ces muscles peut être signe d'une insuffisance respiratoire. L'expiration quant à elle, n'utilise que les muscles de l'abdomen et les intercostaux internes afin de réduire le volume thoracique et chasser l'air hors des poumons.

Ainsi, une inspiration et une expiration constituent un cycle respiratoire. Le nombre de cycle peut varier selon l'effort, on compte en moyenne chez l'adulte 20 cycles par minute au repos contre 50 cycles par minute à l'effort. L'amplitude respiratoire est également mesurable. Au repos, l'amplitude est plus importante mais avec une fréquence plus faible, alors qu'à l'effort l'amplitude est plus faible mais avec une fréquence élevée, permettant ainsi un apport en dioxygène plus rapide au niveau des organes, permis par l'accélération du rythme cardiaque.

#### 1.2.3.2 Pression partielle gazeuse

Les échanges gazeux s'effectuant au niveau alvéolaire se font selon le principe de diffusion passive. Considérons deux compartiments séparés par une membrane, avec un compartiment 1 plus concentré en élément X que le compartiment 2. Tout système biologique et chimique tend à s'équilibrer pour des éléments gazeux et liquides. Ainsi, Un équilibre naturel viendra se créer et un flux d'élément X se mettra en place du compartiment 1 vers le compartiment 2. Pour les gaz, le mouvement d'air se déplace toujours d'un compartiment de

forte pression vers un compartiment de basse pression. On parle alors de pressions partielles en gaz (Figure 10).

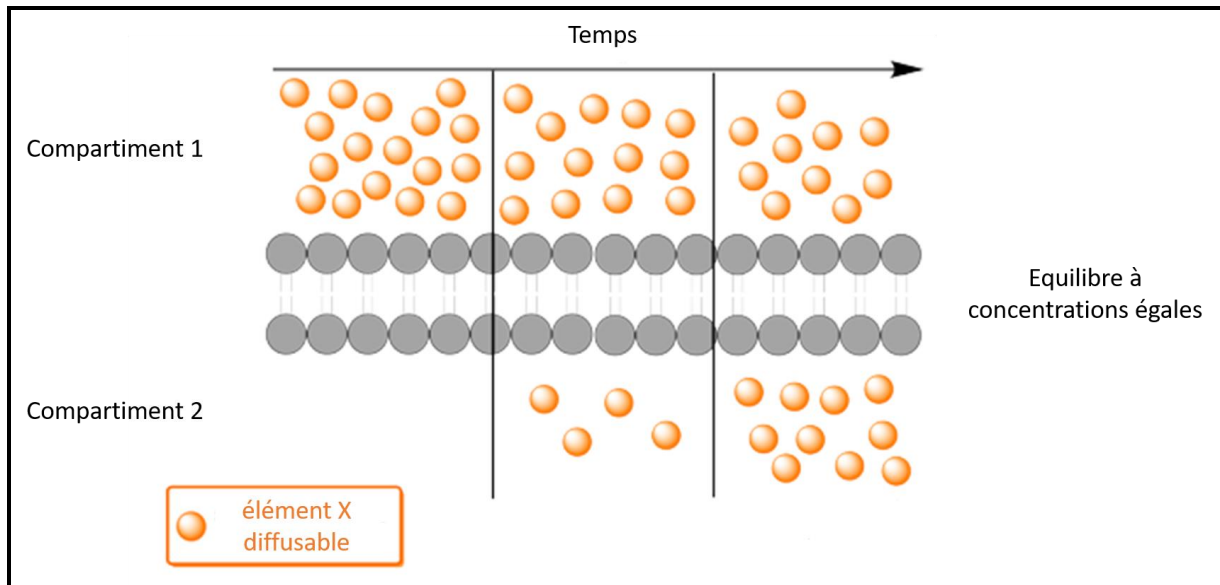


Figure 10 : Principe de diffusion (Adapté de E. Jaspard, 2012).

Pour le cas du dioxygène, on constate que la pression partielle en  $O_2$  dans l'atmosphère est de 160mmHg. Entre les deux cycles respiratoires, « au repos », la pression partielle alvéolaire en dioxygène ( $pp_{AO_2}$ ) est équivalente à la pression partielle en dioxygène atmosphérique grâce au volume réduit des alvéoles (augmentant ainsi la quantité d' $O_2$  par unité de volume). Lors de l'inspiration, le volume alvéolaire augmente, ce qui entraîne la diminution de la quantité d' $O_2$  par unité de volume, et donc la  $pp_{AO_2}$ , faisant rentrer le dioxygène dans les poumons. Au niveau des alvéoles, on atteint alors des  $pp_{AO_2}$  d'environ 100mmHg. L'air s'humidifiant dans les poumons, l' $O_2$  peut alors passer dans le circuit sanguin. Ce passage s'effectue également par diffusion passive, puisque la  $pp_{O_2}$  dans le sang au niveau des alvéoles est de 40mmHg. Une fois dans le sang, le dioxygène pénètre les hématies également par diffusion passive, puis se fixe à l'hème (4 molécules de dioxygène pour un hème) pour le transport de l'oxygène à travers le corps. La  $pp_{O_2}$  peut alors atteindre 75 à 100mmHg dans les artères.

Dans le cas du dioxyde de carbone, les mouvements moléculaires se font également selon le principe de diffusion. La  $pp_{CO_2}$  dans les artères se situe entre 35 et 45mmHg, ainsi la forte pression du dioxygène permet une fixation prioritaire de l' $O_2$  sur l'hème des hématies. La  $pp_{CO_2}$  atteignant le sang alvéolaire est d'environ 45mmHg, alors que la  $pp_{ACO_2}$  (pression

partielle CO<sub>2</sub> alvéolaire) est de l'ordre de 40mmHg, la diffusion s'effectue du sang vers les alvéoles. Son expulsion hors des poumons est ensuite facilitée par l'expiration, et également des mouvements passifs de gaz car la pression atmosphérique en dioxyde de carbone est de l'ordre de 0.3mmHg.

#### 1.2.3.3 O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et pH sanguin

Le pH sanguin se situe entre 7.38 et 7.42. Si celui-ci descend sous la valeur seuil de 7.38, on parle alors d'acidose sanguine, pouvant être d'origine métabolique mais également respiratoire. Lors d'une hypoventilation par exemple, un individu va inspirer moins de dioxygène et ainsi accumuler davantage de dioxyde de carbone dans le sang. Il s'opère alors la réaction suivante :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ . Cette formation d'ions H<sup>+</sup> (hydrogène) diminue ainsi le pH sanguin, ce qui peut être délétère pour l'individu, provoquant une dépression du système nerveux. Si le pH n'est pas régulé, il peut provoquer un coma et la mort de l'individu par défaut de fonctionnement enzymatique. L'hypoventilation peut être morbide notamment chez des patients obèses, pouvant présenter des gênes respiratoires et ainsi des acidoses sanguines. Il se peut que la valeur de pH sanguin dépasse 7.42, on parle d'alcalose sanguine, qui elle aussi peut-être d'origine respiratoire. On l'observe notamment pendant une activité physique. L'hyperventilation permet une pénétration plus rapide de dioxygène dans l'organisme et ainsi son accumulation. Lorsque le dioxygène pénètre le sang, on observe alors la réaction inverse à celle provoquée par le dioxyde de carbone. La consommation d'ions H<sup>+</sup> fait augmenter le pH sanguin. Celle-ci compense alors l'acidose sanguine. Ces deux mécanismes respiratoires permettent de maintenir un pH sanguin stable, et ainsi un fonctionnement correct de l'organisme.

#### 1.2.3.4 Pathologies pulmonaires et enjeux

Les pathologies pulmonaires peuvent être de diverses origines. On distingue dans un premier temps les infections, comme la tuberculose, qui affecte les bronches. Cette pathologie est l'une des 10 plus mortelles dans le monde, ayant tué 1.8 millions d'individus en 2015 selon l'OMS. Une bactérie en est responsable, *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch, infecte les poumons, dont le déclenchement de la pathologie peut être différé par la dormance du pathogène. En association avec le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine),



le bacille de Koch devient alors davantage mortel, responsable d'un tiers des décès de personnes atteintes du VIH. Le BCG (vaccin) est utile pour prévenir les formes graves chez les enfants, cependant chez l'adulte un vaccin est activement en recherche. Il est possible de traiter cette bactérie par des antibiotiques sur 6 à 9 mois, cependant ce pathogène est très résistant à ceux-ci.

On compte ensuite des pathologies de type environnemental. En effet, le tabagisme est l'un des principaux déclencheurs de pathologies pulmonaires. On y trouve entre-autre les Bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO), maladie inflammatoire des bronches caractérisée par un rétrécissement progressif des bronches, entraînant leur obstruction et une gêne respiratoire. Cette inflammation provoque une atrophie des muscles lisses et également une hypersécrétion réactionnelle de mucus. L'inflammation touche aussi les poumons, entraînant une destruction des alvéoles (emphysème). 80% des BPCO sont provoquées par le tabagisme (2015) et concerne 1.7 millions de personnes en France, et représente environ 16 000 décès en moyenne par an (selon l'Inserm). La BPCO ne peut être guérie, cependant elle peut être aisément prévenue compte tenu de l'hygiène de vie mise en jeu dans le déclenchement de la pathologie. Une fois déclarée, elle peut être prise en charge pour ralentir son évolution, notamment par l'arrêt du tabac, un traitement médicamenteux (utilisation de bronchodilatateurs et corticoïdes, oxygénothérapie) et de l'exercice physique.

Parmi ces pathologies environnementales ou idiopathiques, plus rares, on trouve également le cancer du poumon. Celui-ci compte 49109 nouveaux cas par an en France (2017) et présente un faible pronostic vital (30 991 décès par an en 2017), dont 80% serait dû au tabagisme (selon la Ligue contre le cancer), tant sur une consommation active que passive. On distingue ainsi deux types de cancers pulmonaires : cancer bronchique à petites cellules (tumeur agressive, d'emblée disséminée, 20% des cas) et non à petites cellules (carcinomes épidermoïdes, adénocarcinomes et carcinomes indifférenciés, 80% des cas), caractérisé lors de la biopsie. Ainsi, la prévention est de mise dans cette pathologie afin d'éviter tout développement de cancer pulmonaire (arrêt du tabac). Des traitements existent tout de même, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. La chirurgie est également possible dans les cancers non à petites cellules, afin d'exciser la tumeur ou parfois effectuer une lobectomie, voire pneumectomie dans certains cas. Cependant, en fonction de l'étape du cancer lors du diagnostic et de la continuation ou non du tabagisme, une récurrence peut arriver.

Il existe ensuite des pathologies génétiques affectant les poumons. On y trouve par exemple l'asthme, inflammation chronique des bronches (semblable aux BPCO) due à la fois à des prédispositions génétiques et déclenchée par des facteurs environnementaux (une prédisposition ne provoque pas nécessairement l'asthme si l'environnement n'est pas favorable au déclenchement de la pathologie). Chez les patients, l'inflammation des bronches peut être provoquée par des allergènes, le tabac, l'inhalation de produits irritants ou encore la pollution de l'air. Une activité physique peut également déclencher une crise d'asthme. Semblable aux BPCO, on constate une réduction du diamètre des bronches par contraction des muscles lisses bronchiques et une hypersécrétion de mucus, parfois conduisant à une hyper prolifération des cellules de muscles lisses et leur remodelage dans les asthmes sévères. Ainsi, 4 millions de français sont concernés par cette pathologie, néanmoins 95% des cas sont bien contrôlés (les pires cas pouvant aller jusqu'à l'hospitalisation, selon l'Inserm). L'asthme ne se guérit pas, et les traitements se basent alors sur le contrôle de la maladie. Il existe des traitements de fond afin de limiter la fréquence des crises, en utilisant des anti-inflammatoires comme les corticostéroïdes ou anti-leucotriènes, associés à des bronchodilatateurs. Il y a ensuite les traitements de crises, comme les bronchodilatateurs rapides (Salbutamol) pour traiter comme le nom l'indique les crises d'asthme.

Dans les pathologies génétiques, on compte également la Mucoviscidose. Celle-ci est due à la mutation du gène *CFTR*, codant une protéine canal permettant l'échange d'ions chlorures hors des cellules endothéliales pulmonaires permettant la fluidification du mucus. Dans la pathologie, on constate alors une inflammation et un épaississement du mucus dans les bronches (BPCO) provoquant une insuffisance respiratoire. Ce mucus peut également provoquer la prolifération de bactéries comme *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré), *Haemophilus influenzae* ou encore *Pseudomonas aeruginosa* qui déclenchent des infections pulmonaires. Cette pathologie est rare, comptant 6000 cas en France avec 200 naissances d'enfants atteints chaque année (Selon l'Inserm, 2014). La prise en charge de cette maladie a permis une augmentation de l'espérance de vie, passant de 5 ans dans les années 60 à 40 ans aujourd'hui. Les centres de compétences cherchent à réduire les manifestations de la maladie, en utilisant des mucolytiques et fluidifiants bronchiques, et parfois un traitement antibiotique préventif. L'insuffisance respiratoire est traitée par oxygénothérapie, et parfois allant jusqu'à la greffe pulmonaire.

## 2 Famille des Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

### 2.1 Découverte des BMPs

#### 2.1.5 Travaux préliminaires

La présence de facteurs morphogénétiques osseux a été décrite en 1889 par Senn, qui démontra qu'un os décalcifié pouvait être utilisé pour le traitement de l'ostéomyélite, maladie infectieuse provoquant des cavités osseuses (Senn, 1889). Puis, en 1938, Levander put observer qu'un extrait d'os pouvait induire une formation d'os et de cartilage hétérotopique si injecté en intramusculaire chez le lapin. Il put ainsi en conclure que la régénération osseuse apparaissait comme résultante de l'effet d'une substance spécifique permettant la formation osseuse, activant un tissu mésenchymateux non-spécifique (Levanger, 1938). En 1945, Lacroix émit l'hypothèse de l'existence d'un inducteur osseux présent dans l'os, qu'il appelle « Ostéogénine » (Lacroix, 1945). Ces travaux ont permis l'identification à proprement parlé des BMPs (Protéines Morphogénétiques Osseuses) par Urist en 1965 grâce à une seule expérience, qu'il qualifia comme « une seule expérience qui traça la route des BMPs » (Urist, 1965).

#### 2.1.6 Travaux de Marshall R. Urist

Marshall R. Urist, né en 1914 et décédé en 2001, était un chirurgien orthopédique américain travaillant à l'Université de Californie, à Los Angeles. Son travail expérimental incluait une transplantation d'une diaphyse osseuse décalcifiée à l'acide chlorhydrique (HCl), excisée depuis un lapin adulte ou humain dans différents sites intramusculaires chez des lapins, rats, souris et cochons, et également des transplantations dans des défauts osseux chez des lapins et chiens, mais aussi chez des humains présentant plusieurs désordres squelettiques. Il observe ainsi les résultats suivants : quelques semaines après transplantation, du cartilage et de l'os se sont formés à l'intérieur ou autour de la matrice osseuse donneuse. Les premiers dépôts osseux apparurent au bout de 4 à 6 semaines dans des chambres d'excavation très vascularisées. Entre 8 et 16 semaines, l'os est enfin formé par la voie classique d'ossification enchondrale. Urist put alors caractériser ses observations comme de la néo-synthèse osseuse, semblable à l'ostéogénèse post-foétale, par auto-induction, dans laquelle les cellules

inductrices et cellules induites dérivait d'un lit de cellules en croissance (Urist, 1965). Ceci fut alors attribué à la présence d'une substance dans la matrice osseuse, qu'il nomma « Bone Morphogenetic Protein » (BMP).

#### 2.1.7 Identification des BMPs

Suite aux travaux d'Urist, les BMPs sont devenues un point clef de la recherche, montrant qu'il ne s'agissait pas que d'une substance mais d'un groupe de protéines. Les BMPs furent alors classifiées comme une sous-famille de la super-famille des Transforming Growth Factors-beta (TGF- $\beta$ ), large famille moléculaire comprenant des facteurs de croissance et de différenciation incluant les BMPs, TGF- $\beta$ s, Growth Differentiation Factors (GDFs) Activines, Inhibines et l'hormone anti-Müllerienne. Comme les BMPs ont été démontrées comme inductrices de formation osseuse et cartilagineuse, des groupes de recherche ont étudié leur implication dans le processus normal de formation osseuse dans la genèse squelettique (Hall, 1987; Rosen, 1989), la régénération osseuse et la guérison de fracture osseuse (Urist, 1986 ; Luyften, 1992 ; Bostrom, 1995). Wang *et al.* furent les pionniers de la purification des BMPs, extraites d'os bovin et isolées après migration sur gel d'agarose, dont ils découpèrent la bande correspondante puis la digérèrent à la trypsine pour en établir la séquence peptidique (Wang, 1988). Ils purent ainsi différencier 4 BMPs, de BMP1 à BMP4, dont les cDNAs (ADN complémentaires) furent clonés par Wozney *et al.* pour comprendre leur fonctionnement (Wozney, 1988). Ainsi, BMP1 était déjà caractérisée comme métalloprotéinase. BMP2, 3 et 4 furent identifiées, nouveaux membres de la famille TGF- $\beta$ , capables tout comme BMP1 d'induire la néo-formation d'os et de cartilage. D'autres BMPs purent ainsi être identifiées grâce aux homologues de séquences en acides aminés connues des précédentes BMPs (Celeste, 1990 ; Özkaynak, 1990 ; Sampath, 1990).

De nouveaux rôles potentiels pour les BMPs dans d'autres processus physiologiques lors de l'embryogénèse ont été montrés, en montrant la présence de BMPs dans le cerveau, le cœur, les poumons, les reins, la rate et le foie.

## 2.2 Présentation de la famille des BMPs

### 2.2.5 Classification et structure des BMPs

Les BMPs ont une structure hautement conservée que l'on retrouve chez les membres de la famille TGF- $\beta$ . Elles possèdent divers noms, notamment dus aux découvertes extemporanées ainsi qu'aux différents rôles qu'elles possèdent. Ainsi, on distingue les protéines morphogénétiques dérivées de cartilage (CDMPs), les GDFs mentionnées plus tôt, les protéines ostéogéniques (OPs), ostéogénines et Vg-related (Vgr). Cependant, la nomenclature actuelle les a renommées selon le terme de BMP. Selon leur homologie structurale, on peut établir des sous-groupes de BMPs, comprenant le groupe BMP2-4, le groupe BMP5-6-7-8, Le groupe BMP9-10 et le groupe BMP12-13-14. On constate que BMP1 n'est pas inclus dans les groupes, puisqu'il s'agit en fait d'une métalloprotéinase, ainsi que BMP3 puisque faisant partie de la voie de signalisation Smad2-3 propre à TGF- $\beta$  (Smads que je détaillerai ultérieurement).

Tout comme les membres de la famille TGF- $\beta$ , les BMPs sont synthétisées comme pré-peptides inactifs, comprenant un signal peptidique en N-terminal et le peptide mature en C-terminal, séparés par un pro-domaine (Xiao, 2007). Les BMPs précurseurs se dimérisent ensuite par le biais d'un pont disulfure, formant ainsi une protéine homodimérique d'environ 100kDa. Le précurseur BMP sera ensuite clivé par une furine, une pro-protéine convertase permettant de former une BMP mature et biologiquement active d'environ 25kDa (Nelsen & Christiane, 2009) (Figure 12). Ainsi les BMPs fonctionnent en tant qu'homodimères, cependant des recherches ont prouvé l'existence d'hétérodimères ayant des rôles importants comme BMP2/7 révélant une implication dans l'induction du mésoderme (Suzuki, 1997) et BMP4/7 (Yuan, 2011) pour la différenciation des cellules de la moelle osseuse, et plus récemment BMP9/10 comme forme active principale dans le plasma (Tillet, 2018).

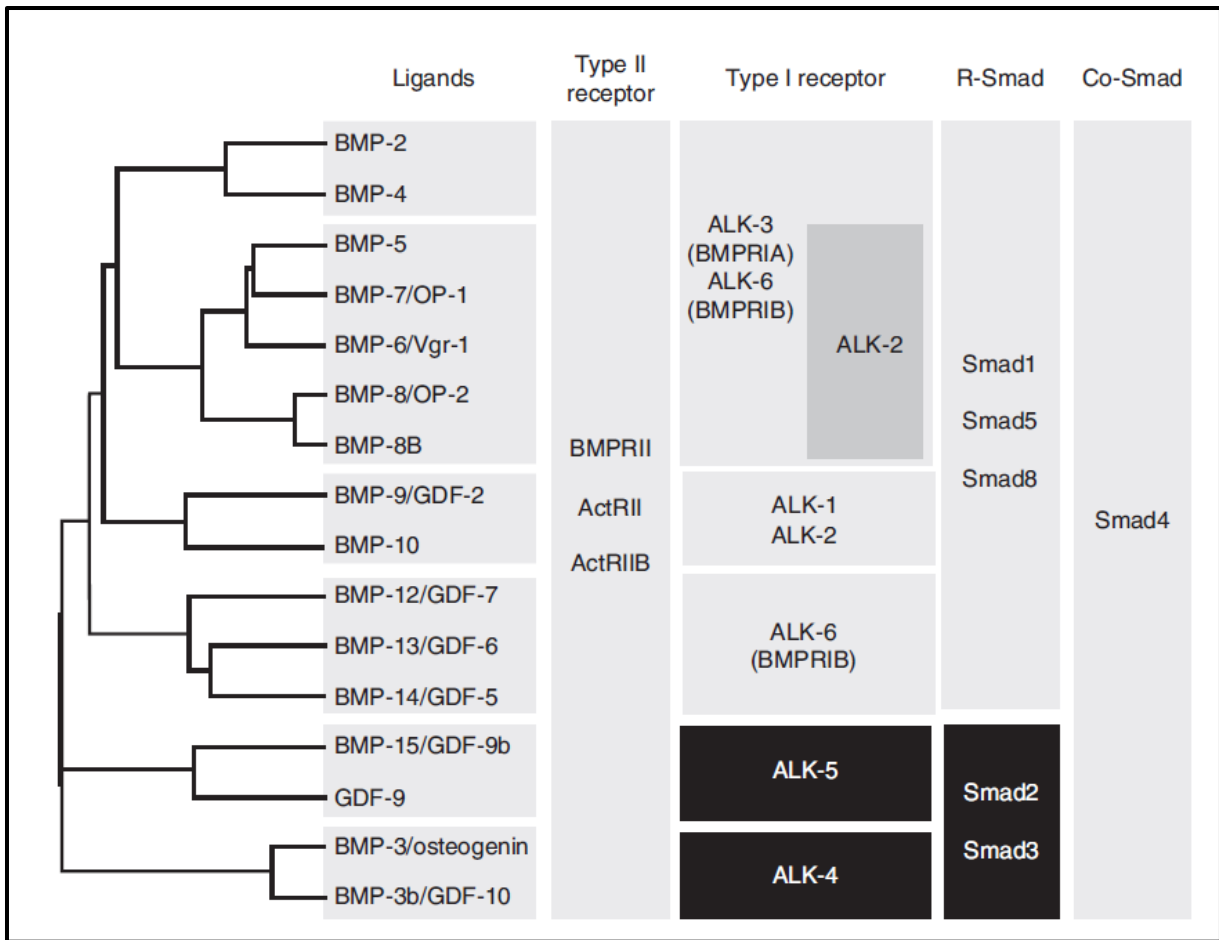


Figure 11 : Famille des BMPs. Présentation des sous-groupes de BMPs, avec les récepteurs de type II et de type I associés, ainsi que les R-Smads et Co-Smad nécessaires à la transduction du signal (Katagiri & Watabe, 2016).

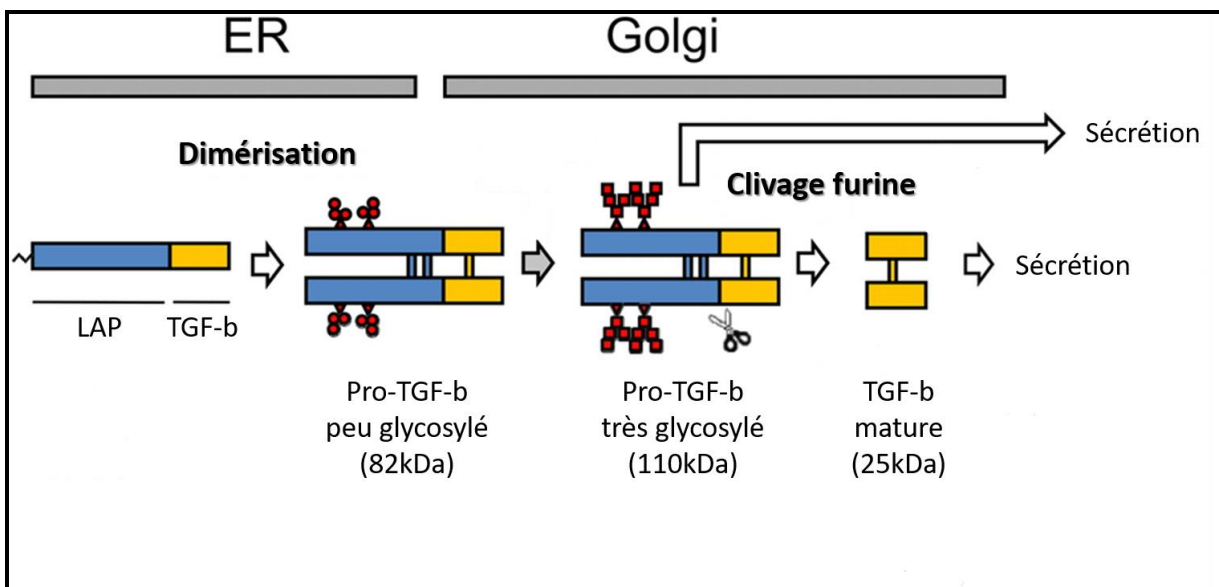


Figure 12 : Etapes de maturation des molécules de la famille TGF- $\beta$ . LAP (latency-associated peptide) ER = Réticulum Endoplasmique. (Adapté de Oida & Weiner, 2010).

### 2.2.6 Récepteurs aux BMPs

Les membres de la famille TGF- $\beta$  effectuent leur voie de transduction par le biais de deux types de récepteurs à activité sérine-thréonine kinase, les récepteurs de type I et de type II. Les BMPs peuvent lier les récepteurs de type I, cependant la liaison aux récepteurs de type II augmente drastiquement l'affinité des ligands aux récepteurs (Rosenzweig, 1995). Ainsi il existe pour les BMPs 3 récepteurs de type II, dans lesquels nous comptons les récepteurs de l'activine de type IIA (ActRIIA) et de type IIB (ActRIIB) et le récepteur des BMPs de type II (BMPRII). BMPRII est spécifique des BMPs, cependant ces dernières lient également les ActRIIA et ActRIIB. Le gène *BMPRII* code pour une protéine BMPRII composée d'une partie extracellulaire (liaison au ligand), un domaine transmembranaire, et une queue C-terminale intracellulaire composée du domaine kinase, le tout formant une protéine de 530 acides aminés. Les récepteurs de type II sont constitutivement actifs et forment un homodimère, ils phosphorylent par une activité sérine-thréonine kinase les récepteurs de types I sur leur domaine riche en glycine-sérine (Figure 13).

Les récepteurs de type I sont appelés Activin receptor-like kinase (ALK) fonctionnant également en homodimères, allant de ALK1 à ALK7 pour la famille TGF- $\beta$ , et semblables structurellement aux Récepteurs de type II avec un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire, et une partie C-terminale intracellulaire comprenant un domaine sérine-thréonine kinase et un domaine glycine-sérine qui sera phosphorylé par le RII. On compte pour les BMPs principalement les récepteurs ALK1, ALK2, ALK3 (BMPRIA) et ALK6 (BMPRII). ALK3 et ALK6 sont structurellement semblables, comme ALK1 et ALK2, mais ces deux groupes sont cependant très éloignés. On constate que ALK2 et ALK3 sont exprimés de manière ubiquitaire, alors que ALK6 par exemple est restreint à l'ostéogénèse (Lin, 2016) et ALK1 aux cellules endothéliales (Seki, 2003). On peut ensuite observer différentes affinités entre les récepteurs et les BMPs, ainsi que les récepteurs de type II utilisés (Figure 10) (Yu, 2005). BMP2 et BMP4 se lient à ALK3 et ALK6 (ten Dijke, 1994), BMP6 et BMP7 se lient faiblement à ALK6 et ALK2 (Ebisawa, 1999), GDF5 (BMP14) se lie fortement à ALK6 (Nishitoh, 1996), puis BMP9 et BMP10 avec haute affinité à ALK1, puis ALK2 (David, 2007 ; Brown, 2005), alors que TGF- $\beta$  lie principalement ALK5 pour une autre voie de transduction. On y trouve par ailleurs GDF-9 et BMP3 qui activent la voie TGF- $\beta$ , à savoir ALK5 et ALK4 respectivement qui conduit, à l'instar des autres BMPs, à la phosphorylation des Smad2 et Smad3 (Mazerbourg, 2004). On constate

que malgré étant membre de la famille BMP, GDF9 et BMP3 active la voie TGF- $\beta$ , qui est distincte de celle des BMPs. BMP3 a également été prouvée comme liant ActRIIB et entrant ainsi en compétition avec BMP2 et BMP4 (Kokabu *et al.*, 2012).

Une fois les récepteurs de type I phosphorylés par les récepteurs de type II, les récepteurs de type I vont à leur tour phosphoryler les Smads via leur domaine sérine-thréonine kinase. On a donc un hétérotétramère fonctionnel activant la voie des Smads 1/5/8.

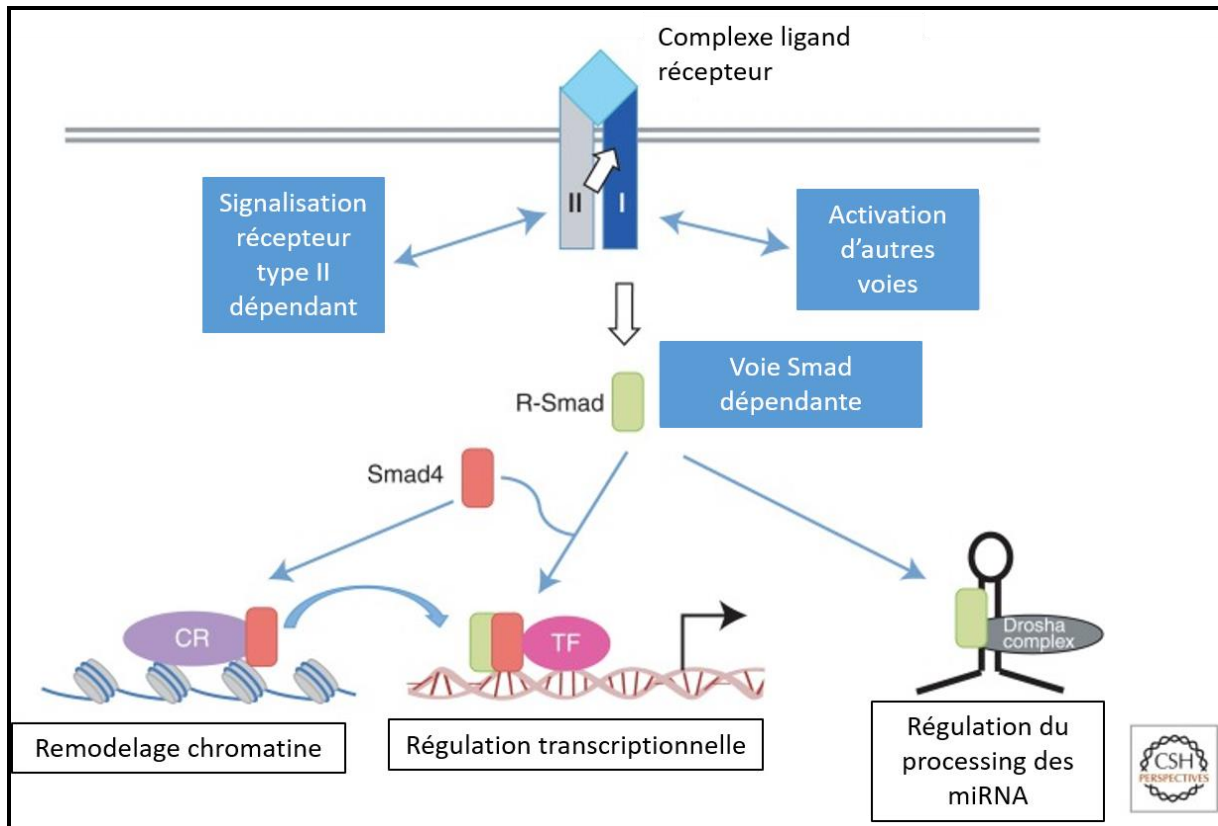


Figure 13 : Présentation de la voie de signalisation canonique des BMPs (Adaptée de Hata & Chen, 2016)

### 2.2.7 Signalisation intracellulaire

Il existe chez les mammifères 8 Smads différentes, de Smad1 à Smad8 (Smad8 est dorénavant appelée Smad9). On distingue alors différentes Smads. Tout d'abord, on distingue les Smads dont l'activité est régulée par les récepteurs, c'est-à-dire Smad1, Smad5 et Smad8, spécifiques à la voie canonique des BMPs (R-Smads), phosphorylés par les récepteurs de type I sur leur domaine C-terminal comprenant un motif S-S-X-S composés de Sérines, spécifique aux R-Smads. On compte également les Smad2 et Smad3 comme R-Smad, mais spécifiques à la voie TGF- $\beta$  (non détaillés ici). 2 R-Smads vont ensuite se coupler à une Smad partenaire, ou



co-Smad, à savoir Smad4. On constatera alors la formation d'un trimère, qui sera transloqué au noyau pour réguler l'expression de leurs gènes cibles en se liant à un SBE (Smad Binding Element), en présence de co-activateurs (p300, CBP, Runx2, GCN5) et de répresseurs (c-Ski, SnoN, Tob ou SIP1). Viennent ensuite les Smads inhibitrices, Smad6 et Smad7, effectuant un rétrocontrôle négatif sur la voie en empêchant la formation du trimère (R-Smads)<sub>2</sub> - Smad4 et son transit vers le noyau. Toutes les Smads ont en commun des séquences conservées. On observe alors une séquence MH2 (Mad Homology 2), ubiquitaire aux Smads en C-terminal, permettant l'interaction aux récepteurs et la formation d'oligomères ; et une séquence MH1 en N-terminal uniquement conservée chez les R-Smads et co-Smads, nécessaire à la translocation nucléaire ainsi qu'à la liaison de protéines liant l'ADN, et à l'ADN directement (Miyazono, 2010) (Figure 14).

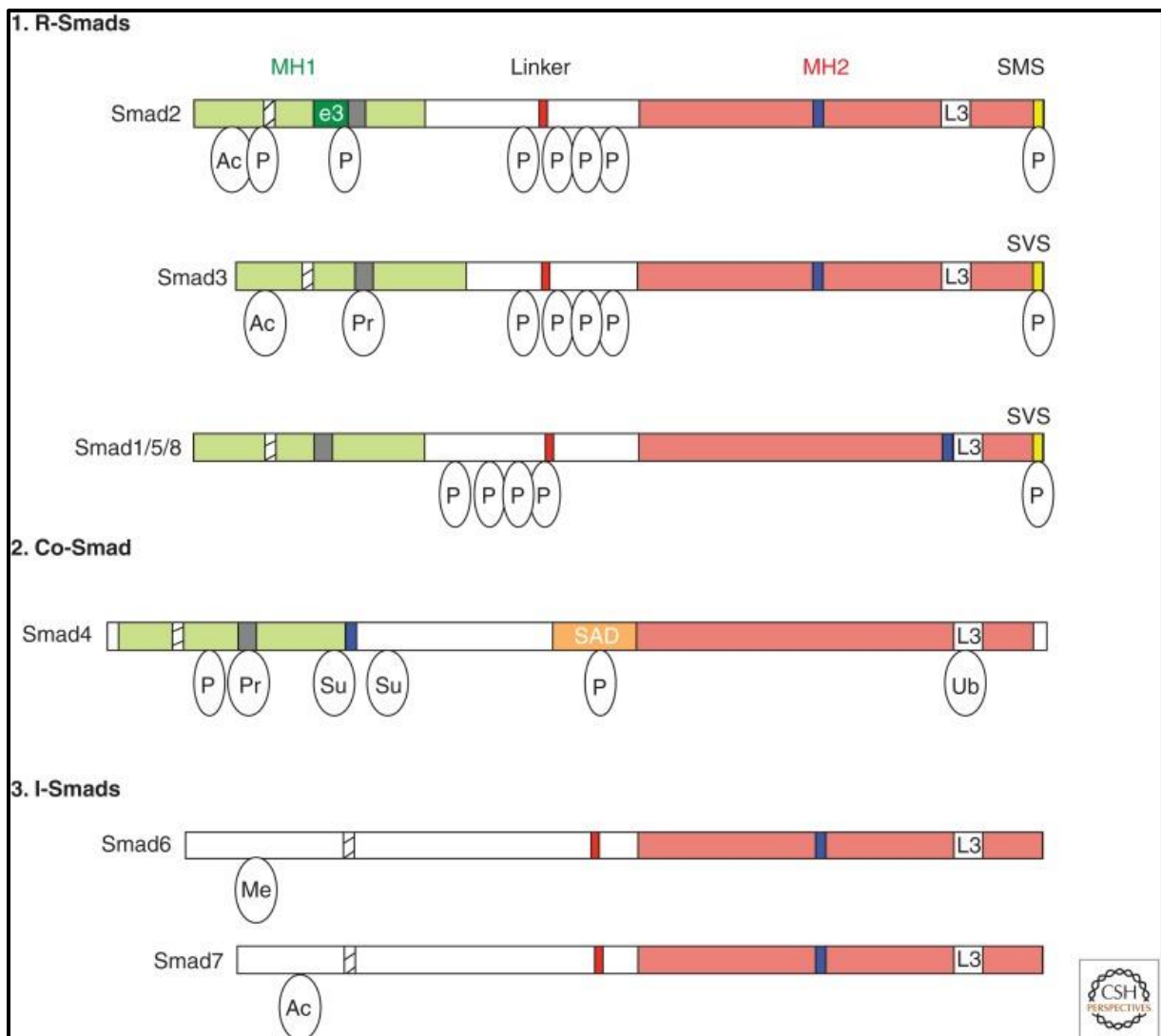


Figure 14 : Représentation schématique de la structure des R-Smads, co-Smads et I-Smads. (Hata & Chen, 2016)

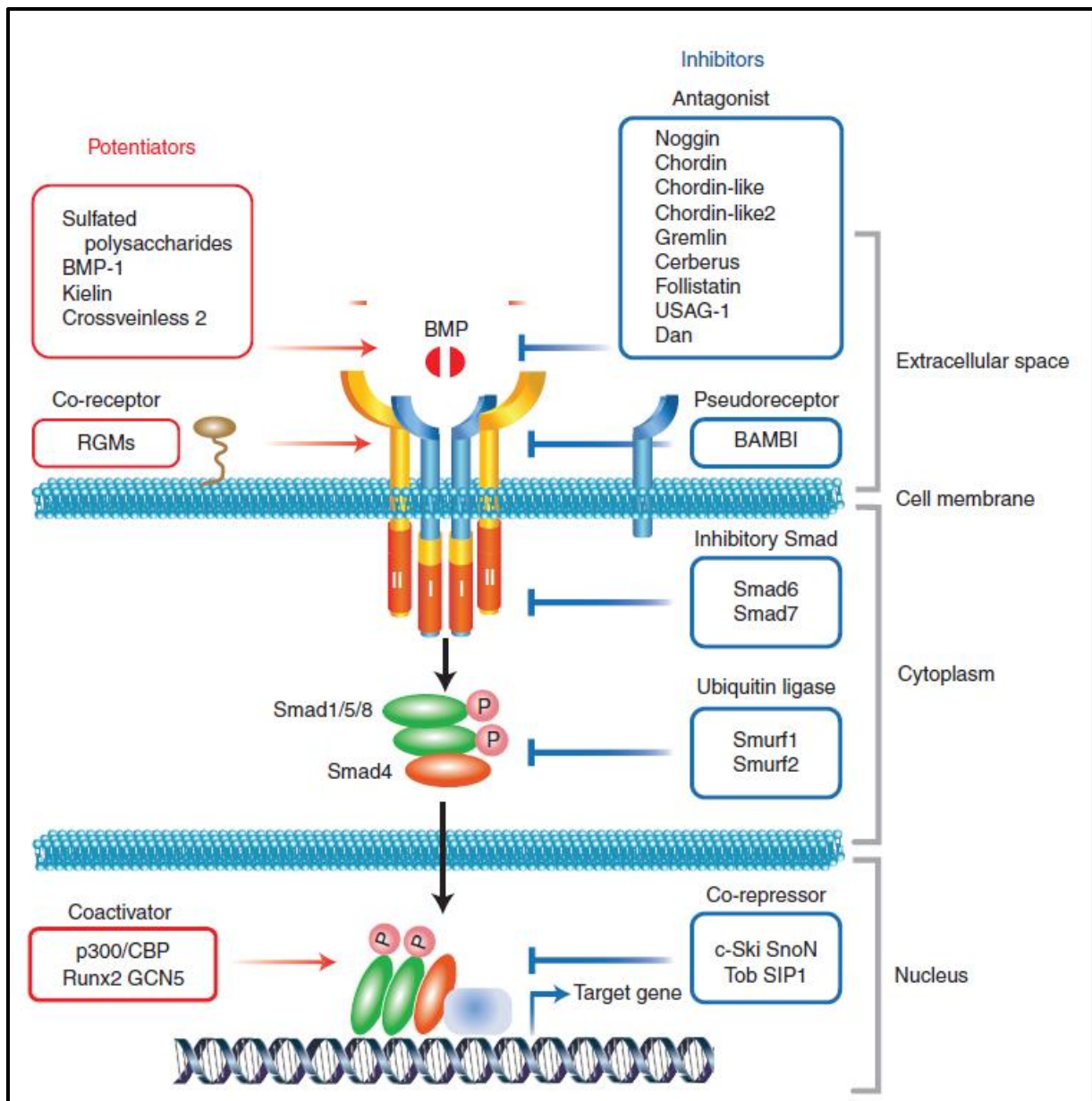


Figure 15 : Voie de signalisations des BMPs avec répresseurs et activateurs de la voie. (Katagari & Watabe, 2016).

Les BMPs peuvent également activer des voies non canoniques, c'est-à-dire non Smad dépendantes comme les mitogen-activated protéines kinases (MAPKs), c-Jun amino-terminal kinase (JNK), Phosphoinositol-3-kinase (PI3K), Akt, et de petites GTPases (Derynck & Zhang, 2003), permettant de réguler de multiples réponses cellulaires.

### 2.2.8 Gènes cibles de la voie

Les progrès technologiques dans le séquençage de séquences d'ADN associées aux protéines comme la Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP), puis les analyses promoter array (ChIP-chip) ainsi que les séquençages associés (ChIP-seq) ont pu mettre en évidence les sites

de liaisons des Smads, variables selon les tissus (Morikawa, 2013). Ainsi, différents travaux ont pu mettre en évidence que les BMPs régulaient différents gènes cibles selon le tissu étudié, montrant ainsi la spécificité cellulaire quant aux gènes régulés par une même voie de signalisation. Par exemple, durant la différenciation ostéoblastique (effectuée sur des C2C12, cellules myoblastiques murines), de nombreux gènes impliqués dans la transduction signalétique et transcription sont modulés de manière précoce suite à une stimulation de BMP (2hrs). Parmi ceux-ci, on trouve notamment les protéines inhibitrices de différenciation *Id1*, *Id2* et *Id3*, également les I-Smads *Smad6* et *Smad7*, ou encore *OASIS*, *Prx2*, *TIEG* et *Snail*, dont l'expression est induite par les BMPs (de Jong, 2004). On constate également des réponses intermédiaires (6hrs de stimulations BMP2) et tardives (24hrs) de gènes de la différenciation osseuse tels que *Hey1* (médiant la voie Notch) et *Tcf7* (médiant la voie Wnt). Pendant l'angiogenèse, BMP4 induit l'expression d'*Id1*, gène considéré comme cible type de la voie BMP, en concomitance avec une induction de VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) et *Tie2*, récepteurs pour VEGF et les angiopoïétines pour réguler la prolifération des cellules endothéliales (Suzuki, 2008).

*Id1* est donc une cible de choix afin d'étudier l'activité des BMPs, plus particulièrement les *Smad1*, *Smad5* et *Smad8*. Dans le promoteur du gène *Id1*, il existe une région GC-riche située à 1kb en amont du site d'initiation de transcription, identifiée comme le BMP-Response Element (BRE) (Katagiri, 2002 ; Korchynskyi & ten Dijke, 2002 ; Lopez-Rovira, 2002). Ainsi, *Smad1* et *Smad4* se lient au BRE pour induire la transcription d'*Id1*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que les BMPs induisaient de manière précoce et spécifique la protéine *Id1* et ce dans différents tissus.

Parmi les autres gènes régulés par les BMPs, on y trouve également *Smad6* qui est induit de manière précoce, semblable à *Id1* (Takase, 1998). Le BRE décrit dans le promoteur du gène codant la protéine *Smad6* contient 28 paires de bases GC-riches, comptant également 4 séquences chevauchantes de motifs GCCGnCGC reconnues par *Smad1* et *Smad5* (Ishida, 2000). *Smad6* étant une *Smad* inhibitrice, la voie BMP interfère elle-même sur sa transduction en mettant en place un rétrocontrôle négatif. On constate que l'expression de *Smad8* est également induite par la voie des BMPs, mais pas par la voie TGF- $\beta$ , et ce en 1hr de stimulation (Tsukamoto, 2014).

## 2.3 Régulation de la voie

### 2.3.5 Répression de la voie

La voie de signalisation des BMPs est régulée de multiples façons, de la partie extracellulaire jusqu'au noyau. A l'extérieur des cellules, les antagonistes des BMPs viennent empêcher la liaison des BMPs sur leurs récepteurs en se liant directement aux BMPs (Brazil, 2015). On compte de nombreux antagonistes, comme par exemple noggin, chordin, chordin like-1, chordin like-2, Gremlin, Cerberus, follistatin, ectodin/uterin sensitization-associated gene-1 (USAG-1), et les membres de la famille DAN (Figure 15). Certains des antagonistes tels que noggin et Gremlin sont induits par les BMPs, suggérant un effet de rétrocontrôle négatif induit par les BMPs (Kameda, 1999 ; Pereira, 2000). On constate que chordin inhibe principalement l'activité de BMP2, BMP4 et BMP7, et noggin surtout BMP5, BMP6, BMP13 et BMP14 (Bragdon, 2011).

On constate ensuite une régulation de la voie au niveau membranaire par BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor), un pseudo-récepteur de la famille des TGF- $\beta$ . Néanmoins, BAMBI ne présente pas de domaine sérine-thréonine kinase intracellulaire. Il agit en inhibant la formation des complexes de récepteurs et donc la transduction du signal des BMPs (Onichtchouk, 1999) en remplaçant les récepteurs de type I dans le complexe hétérotétramérique (Sieber, 2009). L'expression de BAMBI est induite par les BMPs et TGF- $\beta$ , montrant à nouveau un effet de rétrocontrôle négatif (Onichtchouk, 1999).

La régulation intracellulaire s'effectue principalement par les I-smads, comprenant les Smad6 et Smad7 comme décrit précédemment. Celles-ci vont interagir à différents endroits de la cascade signalétique. Au niveau des récepteurs, les I-Smads peuvent lier les récepteurs empêchant alors la phosphorylation des R-Smads. Les I-Smads peuvent également recruter des E3 ubiquitine ligases (Smurf1, Smurf2 et NEDD4-2) qui vont ubiquitiner les récepteurs et les dégrader via le protéasome (Miyazono, 2010). Les I-Smads exercent aussi un rôle sur les R-Smads, empêchant la formation du complexe R-Smad + co-Smad. Il est également possible d'observer une déphosphorylation et ubiquitination des R-Smads, comme une ubiquitination de Smad4 (par Smurf1 et Smurf2), rendant ce trimère inactif. L'expression de Smad6 et Smad7 est induite par l'activation de la voie des BMPs, notamment Smad6 qui est induite de manière

précoce (2hrs) (Jong, 2004) effectuant alors un rétrocontrôle négatif précoce sur la voie Smad1/5/8. On constate également la présence de répresseurs transcriptionnels au niveau nucléaire, comme c-Ski, SnoN et Tob qui conjointement aux I-Smads peuvent interagir sur les promoteurs des gènes cibles de la voie pour réprimer leur expression (Miyazawa & Miyazono, 2017).

### 2.3.6 Potentialisation de la voie

Parmi les régulateurs de la voie des BMPs, on trouve également des molécules capables de potentialiser celle-ci. Comme expliqué plus haut, BMP1 est une métalloprotéase capable de cliver le pro-collagène (Kessler, 1996). Ainsi, BMP1 est capable de cliver le complexe BMP-Chordine afin de libérer les BMPs de leur inhibiteur en clivant directement la chordine, permettant ainsi d'activer la voie BMP (Marques, 1997 ; Piccolo, 1997). Kielin/Chordin like protein (KCP) a été identifiée comme possédant une séquence cystéine-riche de 18 répétitions de cystéines et un domaine de von Willebrand (Lin, 2006). Ainsi, puisque les antagonistes présentent fréquemment ces séquences répétées, KCP peut se lier aux BMPs mais cette fois-ci pour potentialiser l'activité BMP et ce de manière paracrine. On compte également Crossveinless-2 (BMPER, BMP Binding Endothelial Regulator) semblable structurellement à la chordine mais agissant à la fois comme potentialisateur et inhibiteur du signal produit par les BMPs, de manière tissu dépendant puisque déplété dans les cellules endothéliales (Moser, 2003 ; Heinke, 2008).

Il existe des co-récepteurs capables de potentialiser une réponse BMP. On y trouve la famille des repulsive guidance molecule (RGM), comprenant RGMa, RGMb (ou DRAGON) et RGMc (ou hemojuvelin / HFE2). Les RGMs sont capables de se complexer avec les récepteurs de type I et se lient spécifiquement avec BMP2 et BMP4 mais pas BMP7 ou TGF- $\beta$ 1 dans le but de potentialiser une réponse BMP (Nili, 2010 ; Babitt, 2005 ; Samad, 2005). On trouve également l'endogline, dont l'expression est principalement localisée dans les cellules endothéliales, potentialise BMP2 et BMP9, et également le betaglycan, ubiquitaire, potentialise BMP2 et BMP4 (Lowery & Caestecker, 2010 ; Nolan-Stevaux, 2012)

L'activité des BMPs est aussi positivement régulée dans le noyau, dans lequel on y trouve des co-activateurs transcriptionnels comme p300 et CBP (Creb Binding Protein), pouvant se complexer avec les R-Smads phosphorylés pour permettre la transcription des

gènes cibles. Runx2 est capable d'interagir directement avec Smad1 et Smad5 pour participer à la transcription directe des gènes cibles des BMPs (Katagiri & Watabe, 2016).

## 2.4 Lieux d'expression des BMPs

La plupart des BMPs sont exprimés ubiquitairement lors du développement embryonnaire, cependant après la naissance l'expression de certaines BMPs se restreint à certains tissus. On constate alors que les BMP3, BMP4, BMP5 et BMP6 sont très exprimées dans les poumons, et BMP7 abondamment exprimée dans les reins (Özkaynak, 1992). Les ostéocytes et ostéoblastes sont une source importante de BMPs dans la matrice osseuse, où l'expression en ARNm de BMPs y est induite pendant l'ostéogenèse, notamment BMP3 (Kokabu, 2012). On constate aussi l'induction de l'expression de BMP4 lors de la réparation de fracture osseuse dans les « callus-forming cells » (Nakase, 1994). L'expression de BMP4 est induite elle-même par les BMPs, et est plus forte dans les cellules lymphoblastoïdes établies chez les patients atteints de fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) ou maladie de l'homme de pierre, pathologie due à une mutation gain de fonction sur *ACVLR1* codant pour ALK2 (Shafritz, 1996). BMP6 est très exprimée dans les chondrocytes hypertrophiques, cellules possédant des caractéristiques cartilagineuses et osseuses pendant l'ossification endochondrale (Lyons, 1989). BMP9 est produite par les cellules stellaires hépatiques, et circule dans le plasma à la fois sous forme non processée et inactive (40%) et sous forme mature et active (60%) (Bidart, 2012). Le niveau circulant de BMP9 dans le corps humain adulte se situe aux alentours de 6.2ng/mL variant de 2 à 12ng/mL selon les individus, et est suffisant pour induire une signalisation constitutive Smad 1/5/8 dans les cellules endothéliales (David, 2008). BMP10 est produite dans le cœur, dans son intégralité pendant le développement puis plus particulièrement par l'oreillette droite après la naissance, et est nécessaire au développement cardiaque. Son inactivation au stade précoce chez des embryons de souris provoque fatalement leur mort (Chen, 2004 ; Huang, 2012). Plus récemment, BMP10 a été montrée comme également exprimée dans le foie dans les cellules stellaires hépatiques, permettant ainsi la formation de l'hétérodimère BMP9-BMP10, responsable de la majorité de l'activité BMP dans le plasma (Tillet, 2018).

Dans la suite de cette introduction, nous allons nous focaliser sur l'implication de la voie de BMP9 dans ses fonctions physiologiques, et plus particulièrement dans les cellules

endothéliales vasculaires, dont le rôle est crucial au maintien de l'homéostasie vasculaire et dont le dérèglement peut conduire à de sévères pathologies comme la Maladie de Rendu Osler ou l'Hypertension Artérielle Pulmonaire. Ce sont ces deux pathologies que j'ai étudié au cours de ma thèse.

## 2.5 La voie de signalisation BMP9

BMP9 est un facteur de croissance homodimérique avec un nœud cystéique. Avec BMP10, elle constitue l'un des ligands BMP majoritaire agissant sur les cellules endothéliales (David, 2007), point de départ d'une cascade signalétique mettant en jeu un complexe hétérotétramérique de récepteurs comprenant un homodimère de récepteurs de type I (ALK1) et un homodimère de récepteurs de type II (BMPRII, ActRIIA ou ActRIIB). Ces récepteurs à activité sérine-thréonine kinase vont alors médier la signalisation intracellulaire par la phosphorylation des Smads 1/5/8 et de voies Smad-indépendantes, induisant l'expression de nombreux gènes cibles notamment *ID1-3*, *BMPRII*, *SMAD6*, et Notch entre autres (Figure 15). Il a été démontré que le récepteur BMPRII subissait un rapide « turnover » via une dégradation lysosomale (Dunmore, 2013) et que l'induction de l'expression de *BMPRII* par les formes circulantes de BMP9 et BMP10 contribuait au niveau basal de la protéine BMPRII sur les membranes des cellules endothéliales (David, 2007 ; Upton, 2009). L'endogline, co-récepteur de la famille des TGF- $\beta$ , lie à la fois BMP9 et BMP10 avec une forte affinité (Castonguay, 2011) et est nécessaire à la signalisation de BMP9 (Nolan-Stevaux, 2012).

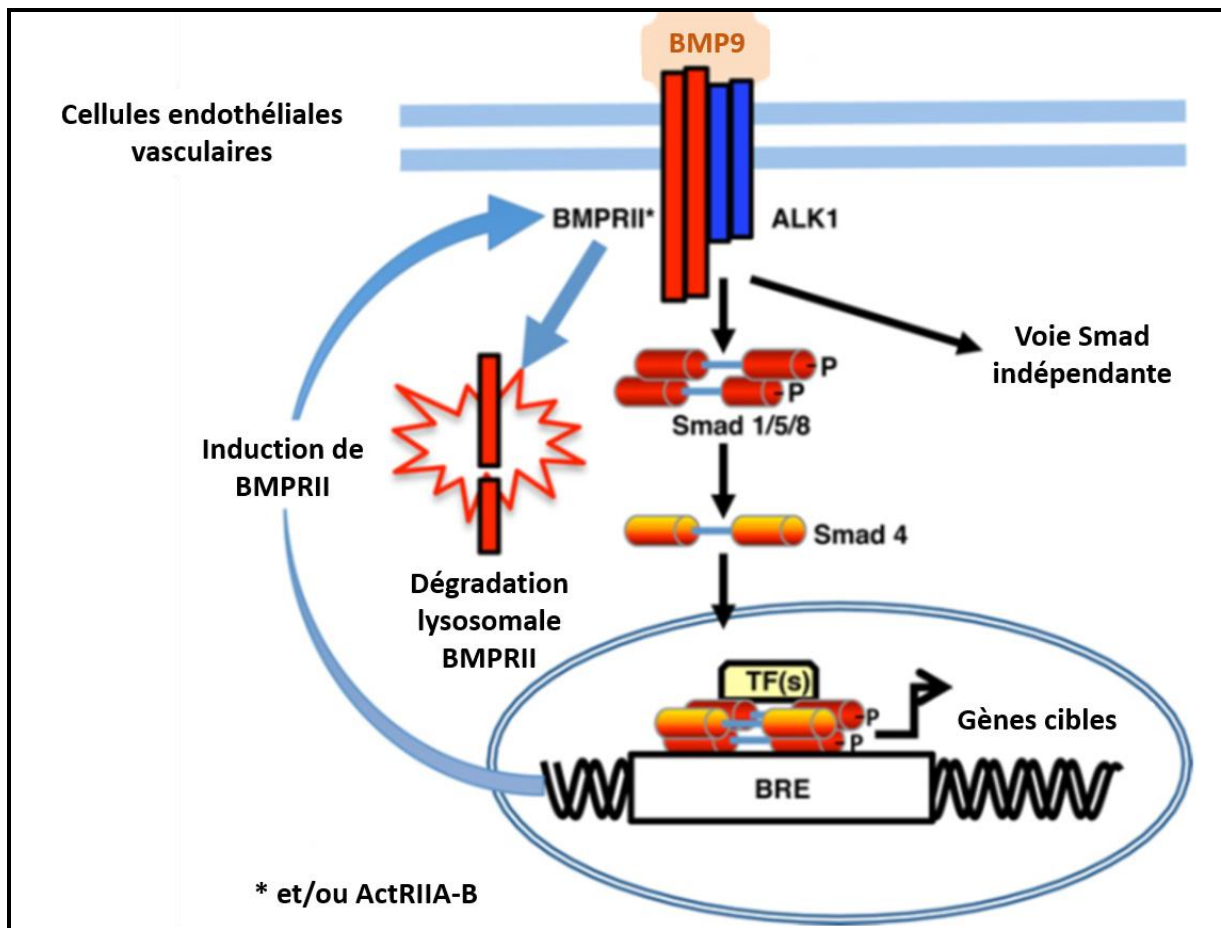


Figure 16 : Schéma de la voie de signalisation de BMP9, (adapté de LI W., 2016).

## 2.6 Rôle vasculaire de la voie BMP9

Le rôle des BMPs est crucial à la formation et au maintien des systèmes vasculaires, et leur implication a été démontrée dans différents désordres vasculaires héréditaires, notamment dans la maladie de Rendu-Osler, ou Télangiectasie Hémorragique Héréditaire (HHT) ainsi que l'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP) (Cai, 2012), que je détaillerai ultérieurement. En condition physiologique, le rôle des BMPs est crucial pour le développement vasculaire. En effet, les BMPs régulent la prolifération et la migration endothéliale (David, 2009). BMP2 et BMP4 régulent ainsi de manière positive la prolifération des cellules endothéliales (Vladimarsdottir G., 2002 ; Suzuki Y., 2008) mais aussi négativement (Kiyono et Shibuya, 2003). Cependant, le rôle de BMP9 est un peu moins clair concernant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. En effet, il a été démontré un rôle inhibiteur à forte dose de BMP9 (Scharpfenecker, 2007 ; David, 2008 ; Ricard, 2012), alors qu'à



faible dose, il promeut la prolifération de différentes lignées endothéliales *in vitro*, sur des plugs de matrigel (Suzuki, 2010). On constate donc des effets différents selon le contexte cellulaire mais également les concentrations en BMP9 utilisées.

Les vaisseaux lymphatiques drainent le liquide interstitiel des capillaires sanguins. Une dysfonction du système lymphatique peut résulter en lymphœdèmes, caractérisés par des gonflements des tissus affectés. Les vaisseaux lymphatiques procurent également une voie de choix pour les métastases de différents cancers, dont les nœuds lymphatiques influent sur la progression du cancer. L'inhibition du signal induit par BMP9 par l'administration d'ALK1-Fc, une protéine chimérique soluble consistant en la partie extracellulaire du récepteur ALK1 fusionnée à un fragment Fc, perturbe la lymphangiogenèse post-natale dans la rétine, la queue et l'oreille, suggérant que BMP9 est impliqué dans la lymphangiogenèse (Niessen, 2010). La signalisation BMP9/ALK1 a également été montrée comme inhibant la formation des vaisseaux lymphatiques à la fois en conditions physiologiques et pathologiques en inhibant la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques (Levet, 2013 ; Yoshimatsu, 2013).

La formation et progression tumorale requièrent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour nourrir la tumeur en oxygène et nutriments. La signalisation établie par BMP9/ALK1 a reçu une attention particulière comme cible anti-angiogénique pour être bloquée pharmacologiquement en utilisant ALK1-Fc afin de piéger BMP9 mais aussi BMP10 (Cunha, 2010). ALK1-Fc en combinaison avec des anti-VEGFR semble diminuer la croissance tumorale. Cependant ceci reste encore discuté aujourd'hui et nécessite plus de clarté quant à l'implication de BMP9 en cancérologie. Il semble finalement que bloquer ALK1 ne soit pas adéquat, puisque BMP9 agirait comme un facteur de quiescence sur la croissance tumorale, les métastases pulmonaires et la normalisation des vaisseaux sanguins pour éviter l'angiogenèse tumorale (Ouarné, 2018).

### 3 La voie BMP9 dans HTAP et HHT

#### 3.1 Télangiectasies Hémorragiques Héréditaires

##### 3.1.1 Présentation de la pathologie

La maladie de Rendu-Osler, ou Télangiectasie Hémorragique Héréditaire (HHT) est une pathologie rare (prévalence de 1/5000 à 1/8 000). Cette pathologie a tout d'abord été décrite par Rendu (1896 - Paris) et Osler (1901 - Baltimore) puis Weber (1907 – Londres) qui l'ont distinguée de l'hémophilie (Brunet, 2009). Le diagnostic de cette maladie repose sur l'association des critères cliniques de Curaçao (Shovlin, 2000), regroupant des épistaxis ou saignements nasaux ; des télangiectasies cutanées (notamment au bout des doigts) ou présentes sur les muqueuses (lèvres ou langue) ; des malformations artério-veineuses (MAV) affectants particulièrement le cerveau, les poumons et le foie (Shovlin, 2010) ; et enfin l'existence d'une personne diagnostiquée Rendu-Osler dans la généalogie proche. Ainsi, le diagnostic clinique est certain si au moins 3 des critères décrits sont présents chez un patient.

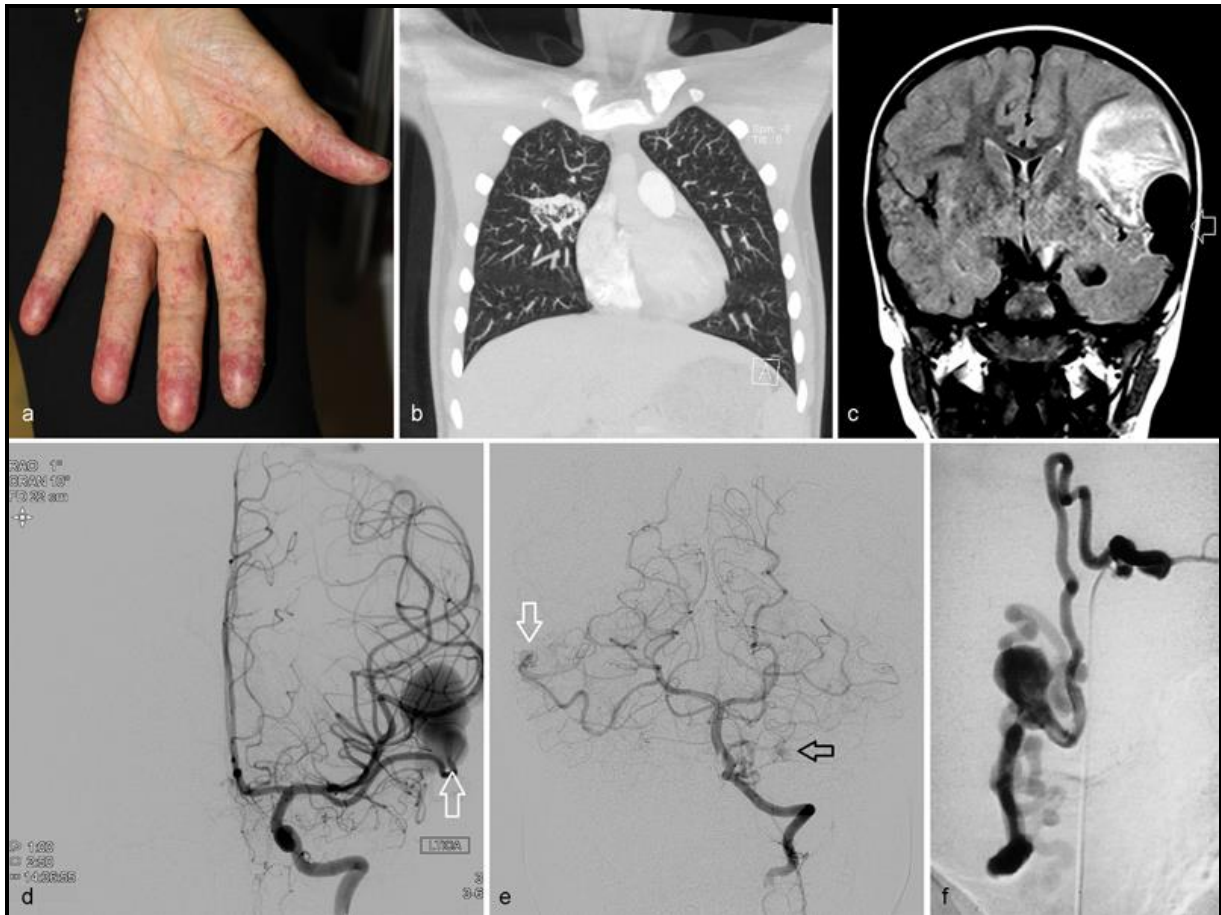
Les méthodes médicales actuelles visent à prévenir les patients des potentiels risques encourus et également de prendre en charge et prévenir si possibles les complications induites par cette pathologie. En effet les MAV peuvent provoquer des accidents vasculaires cérébraux ou hémothorax (si pulmonaires), insuffisance cardiaque pouvant générer une hypertension artérielle ou hypertension portale (si hépatiques), hémorragies cérébrales ou encore hémorragies intestinales lors de MAV digestives. La prise en charge de ces MAV est discutée encore aujourd'hui notamment sur le plan chirurgical, cependant plusieurs études sont en cours pour réduire l'effet « hyper-angiogénique » en utilisant de l'Avastin® ou Bevacizumab, anti-angiogénique dirigé contre le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Dupuis-Girod, 2012), permettant ainsi de diminuer le débit cardiaque et le nombre d'épisodes d'épistaxis (Dupuis-Girod, 2012). Les anémies sont également présentes chez les patients, principalement traitées par du Venofer® ou Ferinject®, pouvant être administré de manière per os ou par voie intraveineuse. Les épistaxis quant à elles, sont le symptôme le plus dérangeant au quotidien pour le patient. Celles-ci nécessitent une attention particulière du patient, pouvant être améliorées par une humidification nasale ou application de pommade évitant la dessiccation de la muqueuse nasale, ou l'application d'anti-angiogéniques ou thrombostatiques (Données

du centre de référence HHT, Lyon). Je détaillerai les traitements plus tard dans la partie suivante.

La maladie de Rendu-Osler est due à des mutations bien identifiées de différents acteurs impliqués dans la voie BMP9. On retrouve ainsi des mutations de :

- *ENG* codant pour l'endogline, un co-récepteur endothélial de la famille des TGF- $\beta$ , définissant ainsi HHT 1 (McAllister, 1994)
- *ACVRL1* (Activin receptor-like kinase 1) codant pour ALK1, récepteur de type 1 spécifique des cellules endothéliales, définissant ainsi HHT 2 (Johnson, 1996).
- *SMAD4*, codant pour le transporteur nucléaire Smad4, plus rare (< 2% des cas) associant la maladie de Rendu-Osler à la polypose juvénile chronique (Gallione, 2004).

Les mutations des gènes *ENG* et *ACVRL1* représentent 90% des HHT, montrant ainsi l'importance de ces récepteurs et de la voie BMP9 dans la pathologie. On observe également des mutations de *GDF2* codant pour BMP9, induisant chez des patients des lésions vasculaires cutanées, présentant un phénotype ressemblant à HHT (Wooderchak-Donahue, 2013). Ces mutations sont autosomiques dominantes, ainsi 1 seul allèle est affecté par la mutation laissant alors le second fonctionnel. Un parent porteur et donc atteint pourra transmettre son matériel génétique pathogène avec un risque de 50% à sa descendance, avec une pénétrance variable selon l'âge, et augmentant avec l'âge.



**Figure 17 : Exemples de télangiectasies hémorragique héréditaires (HHT).** (A.) Photographie de télangiectasies chez une femme avec de nombreuses MAVs. (B.) CT angiographie présentant des MAVs pulmonaires chez un enfant avec HHT. (C.) : IRM présentant une hémorragie cérébrale gauche entourant un large vide de flux chez un patient atteint d'HHT. (D.) Angiographie interne de la carotide gauche du patient (c) présentant une fistule artérioveineuse (flèche) de type 1 avec varice de la veine drainante. (E.) Angiographie vertébrale gauche chez un enfant avec HHT, présentant des MAVs piales de type 3 (flèche blanche) dans l'hémisphère cérébelleux droit, and une malformation capillaire (flèche noire) dans l'hémisphère cérébelleux gauche. Ce patient possède également une MAV pulmonaire. (F.) Fistule Artérioveineuse spinale de type 2, induite par l'artère spinale antérieure. (P.E. Burrows, 2017)

### 3.1.2 Traitements actuels

#### 3.1.2.1 Epistaxis

Les épistaxis représentent la première gêne que les patients rencontrent lors du développement de la pathologie. Aujourd'hui il n'existe pas de traitements médicamenteux ou chirurgicaux permettant de soigner les saignements de manière définitive. Des traitements utilisant des œstrogènes et progestatifs ont été testés avec quelques succès, cependant cela peut être problématique si utilisé chez des hommes ou femme ménopausées, présentant des

effets carcinogènes et cardiovasculaires. L'acide tranexamique, un médicament anti-fibrinolytique a également été testé dans le traitement d'épistaxis (Klepfish, 2001 ; Sabba, 2001; Lozano, 2002) et est prescrit en Europe mais avec une efficacité moindre (Gaillard, 2014).

### 3.1.2.2 Télangiectasies

Les télangiectasies sont traitées au laser Nd:YAG de manière efficace pour les télangiectasies labiales et cutanées chez les patients HHT (Lyons, 1981).

### 3.1.2.3 Malformations artérielles pulmonaires (MAVP)

La vaso-occlusion transcathéter de MAVP à l'aide de spires en acier détachables est devenue la base du traitement. Ceci a été démontré comme efficace par plusieurs groupes, avec un bon profil de sécurité pour les patients (White, 1988 ; Chilvers, 1990 ; Dutton, 1995 Gupta, 2002 ; Mager, 2004 ; Pollak, 2006). De manière moins fréquentes, des ballons détachables ou des occludeurs Amplatzer peuvent être utilisés pour traiter les MAVP. Le traitement des MAVP est particulièrement indiqué lorsque les vaisseaux nourriciers ont un diamètre  $\varnothing \geq 3\text{mm}$  (White, 1988).

### 3.1.2.4 MAV Spinale et Cérébrale

De nombreuses thérapies pour ces MAV ont été proposées, comme la résection chirurgicale, la radiochirurgie stéréostatique ou l'embolisation. Au regard de la méthode choisie, le traitement de ces MAV est réalisé dans un centre de compétence en maladies neuro-vasculaires. Le traitement des MAV asymptomatiques est quant à lui plus controversé. Cependant, la littérature montre un taux de saignement répété chez les patients symptomatiques non opérés de 4% par année, avec une mortalité de 1% par an (Ondra, 1990).

### 3.1.2.5 MAV Gastro-intestinales

Les patients présentant des hémorragies gastro-intestinales ou une anémie sévère non expliquée sont explorés par dépistage endoscopique. Les traitements médicamenteux actuels n'ont présenté aucun effet bénéfique pour ces patients. Si nécessaire, le traitement de l'anémie peut se faire par traitement en fer et transfusion sanguine. Actuellement, les endoscopies utilisant une coagulation au plasma argon ou au laser Nd:YAG sont recommandées pour prévenir des récurrences de saignements gastro-intestinaux.

### 3.1.2.6 MAV Hépatiques

La plupart des patients HHT présentant une atteinte hépatique sont asymptomatiques et ne justifient aucun traitement. L'approche thérapeutique intensive est recommandée pour les shunts hépatiques symptomatiques et dépend du type de complication. L'insuffisance cardiaque observée après hypertension portale est d'abord traitée médicalement à l'aide de diurétiques et de bêta-bloquants, en plus de corriger l'anémie et l'arythmie. L'hypertension portale doit être traitée comme il est recommandé chez les patients atteints de cirrhose hépatique. La nécrose biliaire a un mauvais pronostic et est traitée avec des antibiotiques. L'embolisation et la transplantation hépatique orthotopique (OLT) ne doivent être envisagées que chez les patients ne répondant pas au traitement intensif. L'embolisation des fistules artério-veineuses du foie présente des complications telles que la nécrose hépatique ou biliaire (Faughnan, 2009) et est réservée aux patients qui ne sont pas candidats au traitement OLT. La OLT a été proposée comme la seule option curative définitive des malformations artérioveineuses hépatiques en cas de nécrose biliaire et d'insuffisance cardiaque (Dupuis-Girod, 2010b ; Lerut, 2006). Cependant, le moment optimal pour la transplantation du foie est toujours en discussion car les taux de mortalité et de morbidité après la greffe restent un facteur limitant.

Plus récemment, une approche physiopathologique utilisant des traitements anti-angiogéniques (Ardelean et Letarte, 2015) a été proposée. En effet, en 2006 et 2008, 2 rapports de cas ont présenté l'utilisation du traitement par bevacizumab, avec de nettes améliorations chez les patients atteints de HHT avec une atteinte hépatique sévère et une insuffisance cardiaque (Flieger, 2006; Mitchell, 2008), puis confirmé lors d'un essai en phase II en France (Dupuis-Girod, 2012).

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humain recombinant qui se lie sélectivement et neutralise l'activité biologique du facteur de croissance endothélial vasculaire humain (VEGF). Le bevacizumab inhibe ainsi la liaison du VEGF à ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales.

Cette première étude utilisant le bevacizumab par voie intraveineuse dans HHT a mis en évidence l'efficacité de ce traitement, non seulement sur les lésions hépatiques, comme le montre une diminution de l'hyper-flux cardiaque secondaire aux malformations des vaisseaux

hépatiques, mais également une amélioration significative des épistaxis, ce qui a considérablement amélioré la qualité de vie des patients. Aucun événement indésirable grave lié au bevacizumab n'a été observé.

Depuis lors, de nombreux rapports de cas montrant une amélioration des saignements HHT (épistaxis et digestifs) après le traitement au bevacizumab ont été publiés (Brinkerhoff, 2012; Epperla et Hocking, 2014; Fleagle, 2012; Flieger, 2012; Fodstad, 2011; Follner, 2012; Lazaraki, 2011; Lupu, 2013; Oosting, 2009; Suppressa, 2011 ; Al-Samkari, 2019 ; Garcia-Martin E., 2019) et ce traitement est maintenant envisagé chez les patients HHT présentant des saignements gastro-intestinaux réfractaires (Iyer, 2018). Le premier essai clinique de phase III randomisé portant sur l'efficacité et la sécurité du bevacizumab est en cours (NCT 03227263).

### 3.1.2.7 Traitements anti-angiogéniques

Parmi les inhibiteurs de protéines tyrosine kinase, on trouve certaines molécules anti-angiogéniques disponibles par voie orale. Les inhibiteurs de tyrosine kinase comme le nintedanib et le pazopanib sont de petites molécules qui ciblent le domaine kinase intracellulaire du récepteur du VEGF. Le nintedanib inhibe également le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR), le récepteur du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR) et le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR).

Les effets thérapeutiques potentiels de quatre inhibiteurs anti-angiogéniques de la tyrosine-kinase sur le développement de MAV chez l'adulte dans un modèle HHT murin ont été évalués (Kim, 2017). Ils ont conclu que le sorafénib et un analogue du pazopanib (GW771806) amélioraient significativement le taux d'hémoglobine et les saignements gastro-intestinaux, alors qu'ils n'étaient pas efficaces pour la prévention des MAV de la peau.

Le nintedanib a été utilisé chez un patient HHT après diagnostic de fibroses pulmonaires interstitielles (Kovacs-Sipos, 2017) avec des résultats encourageants. Son score de sévérité d'épistaxis a considérablement diminué.

Le pazopanib, un autre inhibiteur de la tyrosine kinase, a été testé à une dose de 50 mg/jour (Faughnan, 2018) et a montré des résultats prometteurs dans le traitement des saignements liés à HHT (NCT02204371). Malheureusement, cette étude a été arrêtée, mais deux autres études sont prévues en Amérique du Nord sur ce médicament (NCT03850730 et NCT03850964).

En France, une étude multicentrique randomisée versus placebo est menée afin d'évaluer l'efficacité du traitement au nintedanib per os sur la durée de l'épistaxis chez les patients HHT présentant une épistaxis modérée à sévère (NCT03954782).

La thalidomide et la lénalidomide ont un effet anti-angiogénique bien connu (Teo, 2005), qui est dose-dépendant. Le traitement à la thalidomide a induit une maturation vasculaire dans un modèle expérimental de HHT et une diminution de l'épistaxis chez 6 patients HHT (Lebrin, 2010). Des saignements réduits ont été observés chez des patients HHT ayant reçu la thalidomide comme traitement anticancéreux anti-angiogénique (Kurstin, 2002; Perez-Encinas, 2002). Dans des rapports de cas et quelques études de petite taille chez HHT, la thalidomide a constamment amélioré la gravité et la fréquence de l'épistaxis et amélioré les concentrations en hémoglobine tout en réduisant le besoin de transfusion (Chen, 2012; Franchini, 2013; Hosman, 2015 ; Invernizzi, 2015). Cependant, des études contrôlées par placebo sont nécessaires pour confirmer l'efficacité et l'innocuité de la thalidomide ou de la lénalidomide chez les patients HHT. De plus, l'utilisation de la thalidomide est limitée par les données de sécurité. En effet, des doses de thalidomide  $\geq 100$  mg par jour peuvent provoquer une neuropathie périphérique, une thrombose veineuse profonde, une somnolence et une constipation. La lénalidomide inhibe la production de VEGF et présente un meilleur profil de sécurité par rapport à la thalidomide. Les effets indésirables les plus courants de la lénalidomide ont été l'anémie, la constipation et la somnolence (Teo, 2005).

Ainsi les traitements actuels visent à améliorer les symptômes et éduquer les patients face aux risques encourus, mais il n'y a pas encore de réels traitements afin de corriger le dysfonctionnement endothélial en cause dans les saignements et les MAVs. Un traitement préalable visant la voie BMP9 avant l'apparition de signes caractéristiques de la maladie est donc crucial pour les patients.

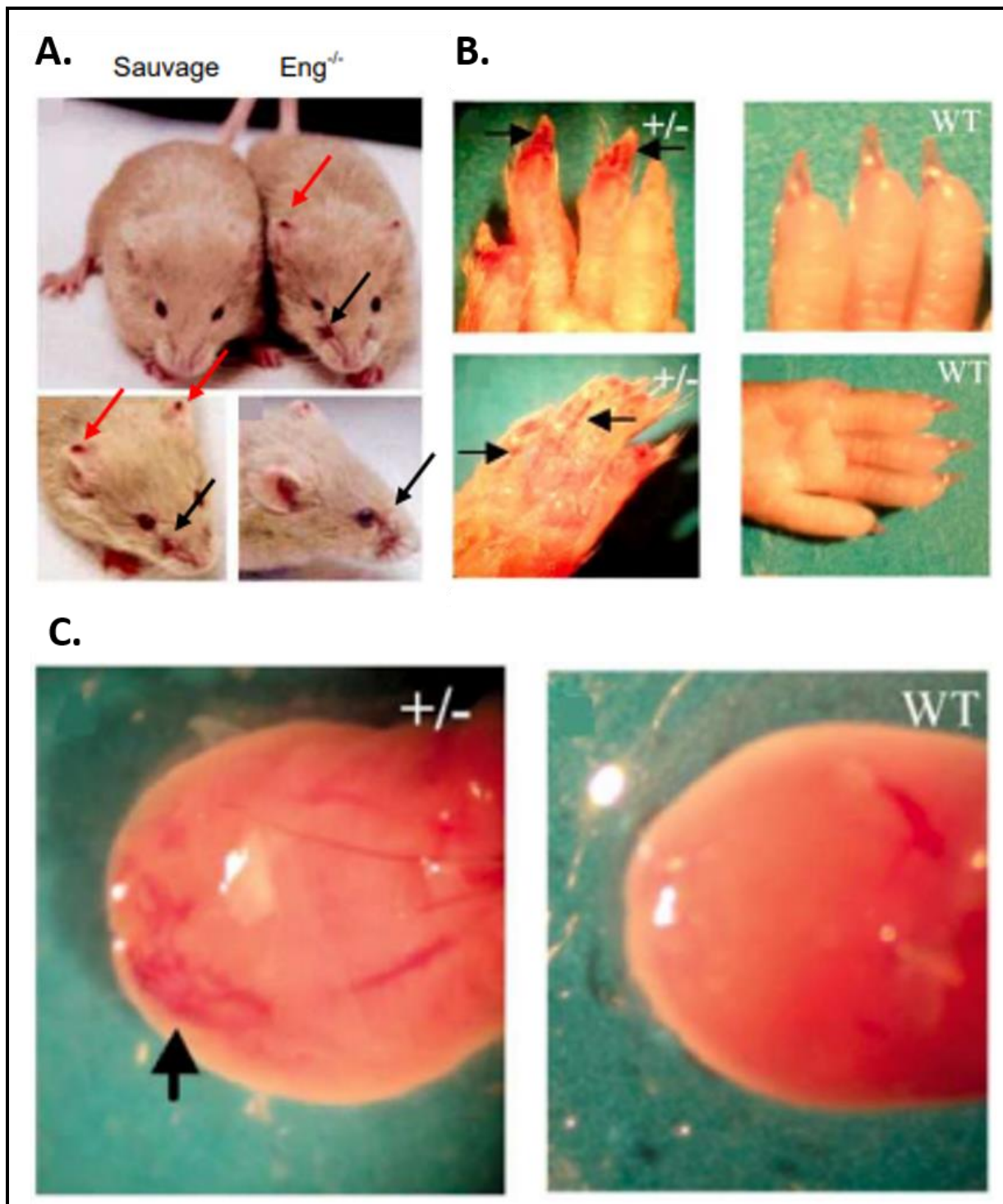


### 3.1.3 Modèles animaux HHT

#### 3.1.3.1 Invalidation d'Alk1 et Endogline

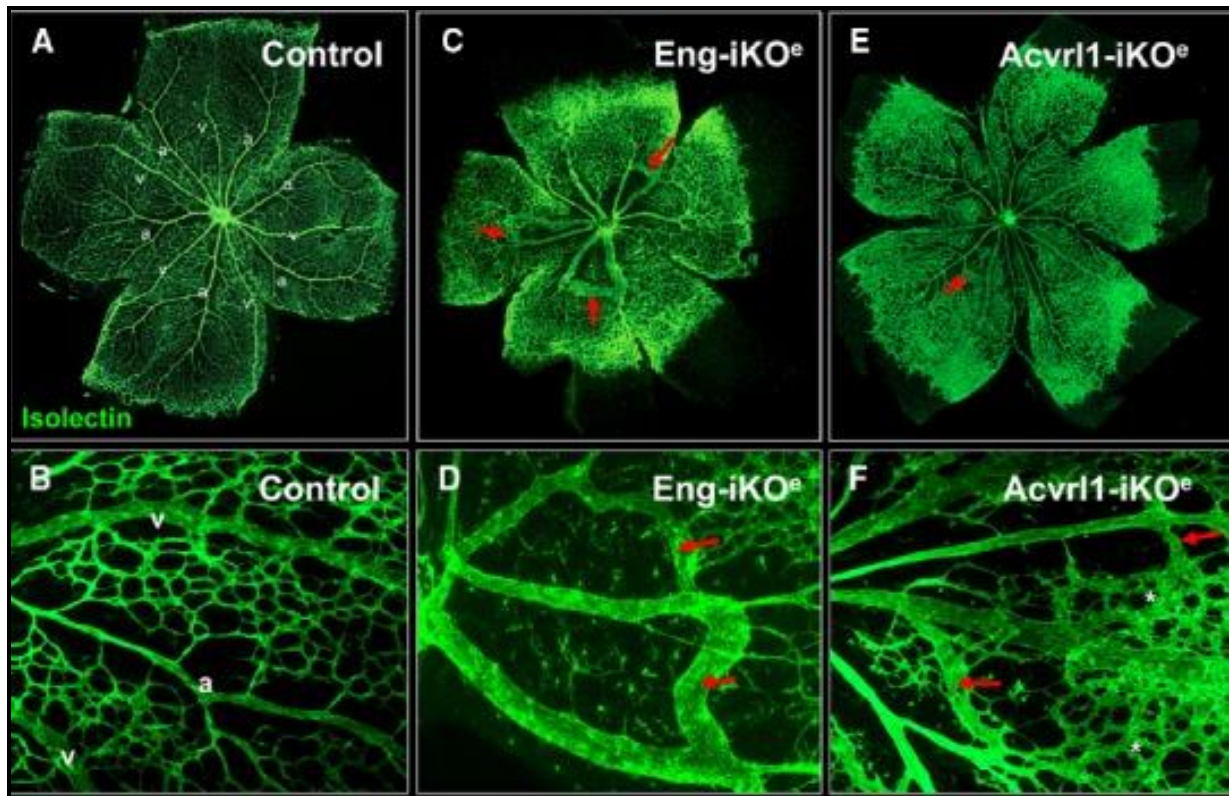
Dans un premier temps, les premiers modèles furent des souris invalidées pour soit *Acvr11*<sup>-/-</sup> ou *Eng*<sup>-/-</sup>. La perte totale d'Endogline conduisait à des défauts cardiovasculaires et la mort embryonnaire en cours de gestation (Bourdeau, 1999; Li, 1999; Arthur, 2000), montrant l'importance de l'Endogline dans l'angiogénèse et la mise en place du système cardiaque. On constate des phénotypes semblables chez des souris invalidées en *Acvr11* (Oh, 2000). Néanmoins les observations obtenues ont permis de mettre en évidence que les MAVs dans HHT résultaient bel et bien d'un défaut moléculaire.

Ensuite, d'autres modèles murins ont été développés et visaient à reproduire les mutations décrites dans HHT, notamment *Acvr11*<sup>+/-</sup> (Srinivasan, 2003) et *Eng*<sup>+/-</sup> (Bourdeau, 1999) cependant avec des phénotypes légers. Ceci a tout de même permis de constater que la maladie ne se déclenchait pas de manière immédiate, mais nécessitait des évènements déclencheurs multiples pour le développement de lésions. Les souris invalidées *Acvr11*<sup>+/-</sup> présentent des vaisseaux dilatés et des lésions hépatiques, à la base de l'ongle, intestinales, cutanées et apparaissent entre 7 à 20 mois (Srinivasan, 2003). Ces lésions apparaissent avec une pénétrance incomplète (40%). Les souris *Eng*<sup>+/-</sup> présentaient également des lésions vasculaires comme des saignements nasaux, télangiectasies auriculaires, et une dilatation vasculaire observable entre 3 mois et 2 ans. Les lésions se développent par ailleurs plus fréquemment dans le fond génétique 129/Ola (40 à 50% des animaux). Le modèle hétérozygote a ainsi permis d'identifier la thalidomide comme sauveteur de la couverture vasculaire des cellules de muscles lisses, dont la couverture est amoindrie chez les 129/Ola *Eng*<sup>+/-</sup> et également observable chez les patients HHT (Lebrin, 2010) (Figure 18).



**Figure 18 : Exemple de modèle murins pour HHT, invalidés Eng et ALK1.** (A.) : Les souris hétérozygotes pour l'endogline dans le fond génétique 129/Ola présentent des télangiectasies au niveau des oreilles (flèches rouges) et des saignements de la muqueuse nasale (flèche noire) (Bourdeau A., 1999). (B.) : Les souris hétérozygotes pour ALK1 présentent des lésions vasculaires sous les griffes (flèches), (C.) des télangiectasies sur la langue (flèche), et aussi des lésions vasculaires dans les poumons, des nodules et des hémorragies hépatiques dans certains lobes (non montré) (Srinivasan S. 2003).

Au lieu d'invalider depuis la naissance les gènes ci-décrits, une technologie de CreERT2-lox a permis d'établir des lignées de souris viables dans lesquelles les gènes d'intérêt sont délétés à un temps donné. La délétion est cette fois-ci homozygote, en utilisant un type cellulaire spécifique à un temps donné, et présente de robustes MAVs cutanées semblables à celles observées chez les patients HHT, tant pour *Acvr11* que *Eng*. Cependant, les MAVs ne sont observables que dans les endroits où l'environnement est pro-angiogénique et inflammatoire. La vascularisation rétinienne est très utilisée pour observer la formation de MAVs (cependant non observées chez les patients), et suit dans les premières semaines de développement un processus d'angiogénèse bien défini. Les vaisseaux partent du centre de la rétine près du nerf optique au premier jour postnatal (P1), et se développent vers la périphérie pour former un réseau vasculaire très organisé vers P8 (Fruttiger, 2007 ; Stahl, 2010). De cette façon, les vaisseaux sanguins forment une rosace caractéristique alternée de veines et d'artères avec un réseau capillaire les séparant. Ainsi, lorsque que les Knock-out sont induits par injection de tamoxifène, on peut observer par immunofluorescence la présence de MAVs sur le réseau vasculaire rétinien (Figure 19).

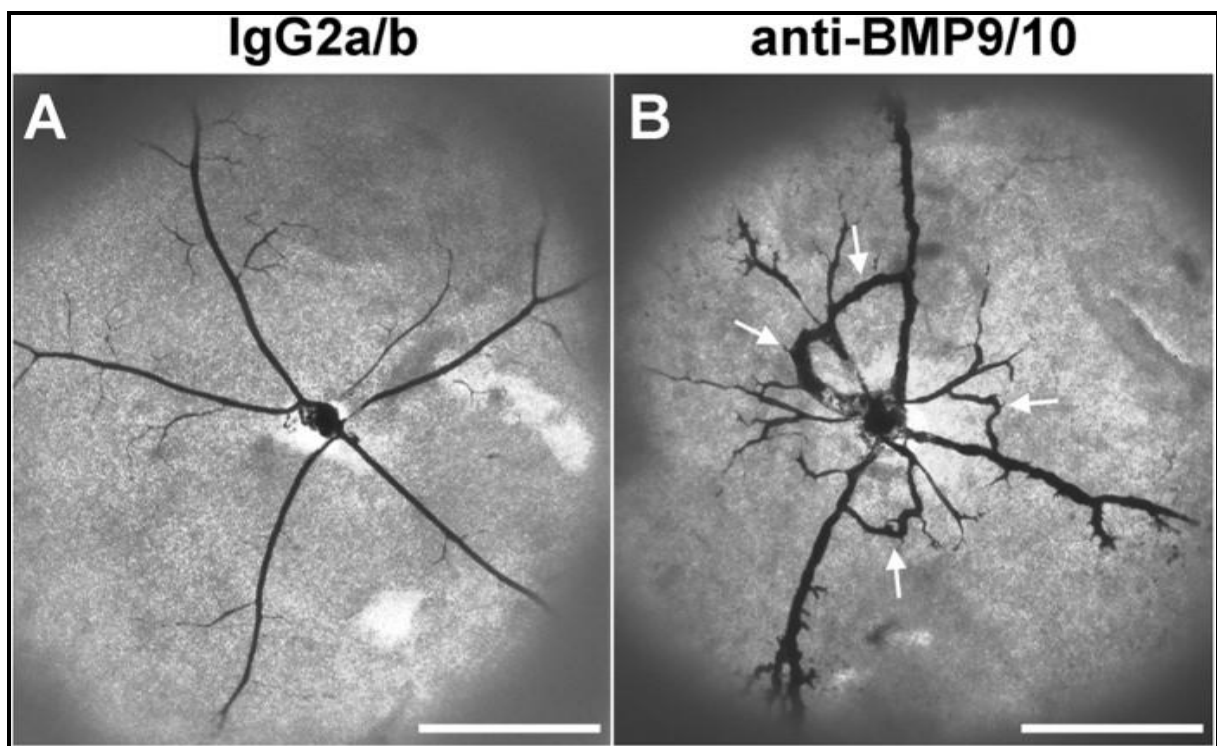


**Figure 19 : Malformations artério-veineuses dans les rétines néonatales de souris après une perte spécifique endothéliale de l'expression de Eng ou Acvrl1.** Les cellules endothéliales de la rétine néonatale sont marquées avec une isolectine fluorescente pour révéler une architecture bidimensionnelle normale du plexus vasculaire au septième jour postnatal (P7). L'organisation des artères (a) et des veines (v) est régulière avec des réseaux capillaires intermédiaires (A) et à plus fort grossissement (B). Les artères sont facilement reconnaissables aux zones libres capillaires qui les entourent (A, B). Après l'invalidation spécifique endothéliale de l'endogline (par traitement au tamoxifène des nouveau-nés *Eng fl/fl*; *Cdh5-CreERT2*, *Cdh5* = Cadherin 5), les vaisseaux rétiens *Eng-iKOe* à P7 montrent une progression retardée du plexus vasculaire, ainsi que des connexions anormales entre les artères et les veines, ce qui génère plusieurs MAVs [flèches rouges en (C) et visibles dans les images de plus fort grossissement en (D)]. La perte spécifique endothéliale de *Acvrl1* conduit à des MAVs (flèches rouges en E, F), à un hyperbranchement (F, astérisques) et à un élargissement des veines (Mahmoud et al., 2010; Tual-Chalot et al., 2014).

### 3.1.3.2 Invalidation de BMP9 et BMP10

Il existe des anticorps bloquant l'activité de BMP9 et BMP10 afin d'évaluer l'effet de leur invalidation sur la formation de MAVs dans le modèle murin, en injectant soit un anticorps anti-BMP10 dans une souris BMP9-KO, ou une injection conjointe des deux anticorps anti-BMP9 et anti-BMP10 dans une souris sauvage. Ceci conduit alors à une hyper-vascularisation à P5 lorsque les anticorps sont injectés directement de P1 à P4 (Ricard, 2012 ; Chen, 2013), et des défauts vasculaires semblables à ceux observés dans les modèles de KO conditionnels pour *Acvrl1* et *Eng* rappelant la pathologie HHT (Tual-Chalot, 2015).

Ainsi, Ruiz *et al.* ont proposé une méthode originale afin de limiter les écarts d'injection entre chaque animal et le stress que cela pouvait imposer aux animaux, en choisissant d'injecter les anticorps anti-BMP9 et anti-BMP10 par la voie du lait maternel dans la circulation des souriceaux (Ruiz, 2016). Pour ce faire, les mères sont injectées en intra-péritonéal à P3 en anticorps anti-BMP9/anti-BMP10 (15mg/kg). Les souriceaux sont ainsi nourris pendant trois jours au lait maternel, puis sont euthanasiés à P6. Les niveaux en sérum d'anticorps sont alors mesurés, donnant des quantités en anti-BMP10 de 30µg/mL et anti-BMP9 de 50µg/mL, montrant l'efficacité du système établi. En regardant la vascularisation rétinienne, on constate également la présence de shunts directs entre les veines et les artères (Figure 20). Ainsi, l'immuno-blocage anti-BMP9/10 par la voie du lait maternel a entraîné une pathologie vasculaire importante dans la rétine, comprenant une hyper-vascularisation, des anomalies de la spécification artérioveineuse et la présence de MAVs multiples et massives.



**Figure 20 : Le transfert par voie du lait maternel des anticorps bloquants BMP9 et BMP10 induit des MAVs dans les rétines néonatales de souriceaux.** (A, B) Images représentatives du système vasculaire rétinien perfusé au latex bleu de nouveau-nés P6 nourris pendant 3 jours par des mères injectées sur P3 avec des anticorps IgG2a/b témoins (A) ou bloquant BMP9/10 (B). Les flèches en B indiquent les MAVs. Barres d'échelle : 500 µm (Ruiz *et al.*, 2016).

## 3.2 Hypertension Artérielle Pulmonaire

### 3.2.5 Présentation de la pathologie

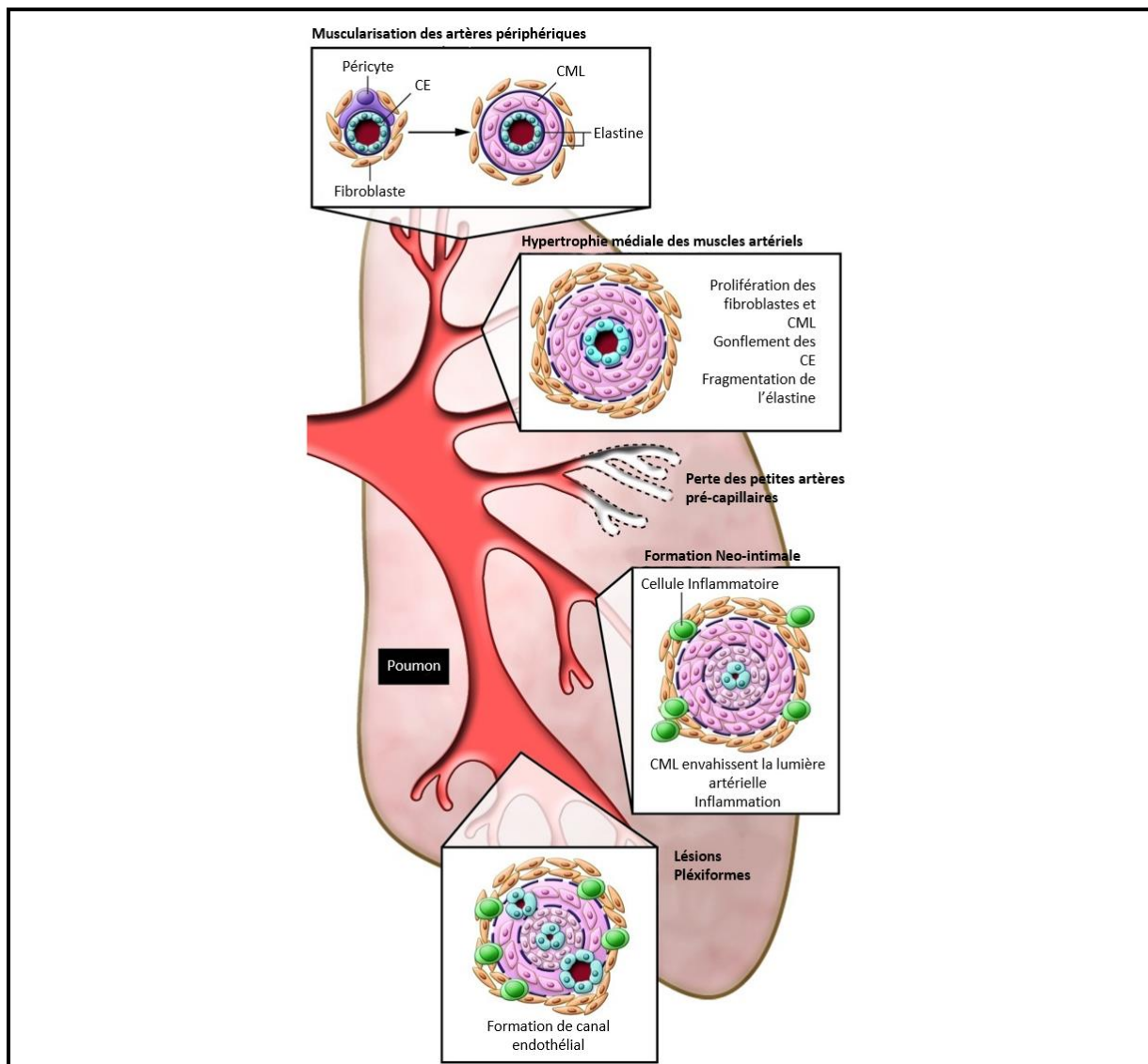
L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie plus rare (15 à 50 cas sur 1 million en Europe) qui se caractérise principalement par une élévation de la pression artérielle pulmonaire ( $\geq 25$ mmHg au repos). Ceci est dû à un remodelage vasculaire induisant un épaissement de la paroi vasculaire provoquant des lésions plexiformes, au détriment de la lumière des vaisseaux sanguins dans les artérioles pulmonaires. Une augmentation de la pression artérielle pulmonaire provoque une hypertrophie cardiaque, plus particulièrement du ventricule droit, afin de générer une force contractile suffisante face à l'élévation de la post-charge (Naeije and Manes, 2014). Ce phénomène est délétère puisque celui-ci se fait au détriment de la cavité cardiaque qui rétrécit, conduisant à une dyspnée puis un arrêt cardiaque, et enfin la mort du patient (Rabinovitch, 2008). L'HTAP présente par ailleurs un faible pronostic puisque les patients ont un taux de survie de 2.8 ans après diagnostic. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement efficace pour soigner l'HTAP. Les thérapies actuelles incluent principalement des molécules avec des propriétés vasodilatatrices pour améliorer les fonctions cardiopulmonaires. Cependant, la pathologie vasculaire oblitératrice continue de progresser, laissant alors la transplantation cœur-poumon comme seule option pour la plupart des patients. La prévention se fait également auprès des patients, par exemple pour améliorer l'hygiène de vie. Cela prend en compte d'éviter les régimes salés rehaussant la pression artérielle, éviter les efforts physiques pouvant engendrer un essoufflement sévère, syncopes ou douleurs thoraciques, et même d'éviter les voyages en altitude pouvant provoquer des phlébites ou embolies.

C'est pourquoi de nouvelles approches sont nécessaires, afin de se focaliser sur l'activation de mécanismes réversant le remodelage vasculaire.

L'HTAP peut avoir plusieurs origines : elle peut être idiopathique, associée à des facteurs environnementaux ou à des pathologies, ou héréditaire. La forme principale d'HTAP est celle associée aux facteurs environnementaux (comme la vie en altitude, la cigarette) ou associée aux pathologies (inflammations, VIH). Celle-ci constitue environ 50% des cas de HTAP en France. Ensuite, Les formes idiopathiques (sans origine particulière) constituent la

deuxième forme principale de l'HTAP en France, soit 40% des cas décrits. Enfin, la troisième forme est d'origine familiale ou héréditaire, constituant 4% des formes d'HTAP en France. C'est principalement cette dernière forme que je vais présenter.

En effet, l'HTAP héréditaire est due à une mutation d'un gène codant pour un récepteur de type 2 de la voie BMP9, à savoir *BMPR2*, mutation également autosomique dominante (Deng, 2000). Cependant cette mutation a une pénétrance de 20%, montrant que la mutation ne conduit pas systématiquement au déclenchement de la pathologie. Par ailleurs des recherches identifient également *ACVRL1* comme responsable de l'HTAP, montrant une prédisposition des patients à déclencher une HTAP avec une mutation pour le gène codant *ALK1* (Trembath, 2001). Les patients présentaient alors des signes hémodynamiques et histologiques identiques à une HTAP chez des patients présentant des mutations de *BMPR2*. Ainsi, les investigations concernant les mutations sur *ACVRL1* se sont enchaînées afin de prouver l'implication de ce gène dans l'apparition de l'HTAP (Harrison, 2003-2005 ; Abdalla, 2004; Fujiwara, 2008). Puis, plus récemment, des mutations concernant le gène *GDF2* codant pour la protéine BMP9 ont montré son implication dans le déclenchement d'HTAP (Wang, 2016 ; Wang, 2019). Plus rarement, il a été observé une mutation du gène codant la protéine *Smad8* (Shintani M, 2009), entraînant sa perte de fonction, ainsi que des mutations de la protéine *Smad4* (Nasim, 2011) provoquant une signalisation diminuée de la voie BMP9.



**Figure 21 : Anomalies vasculaires associées à l'HTAP.** Ce schéma présente les anomalies présentes à travers la circulation pulmonaire : muscularisation anormale des artères pré-capillaires distales et médiales, perte des artères pré-capillaires, épaissement des artères pulmonaires, formation néo-intimale particulièrement occlusive dans les vaisseaux à diamètres inférieur à 500 $\mu$ m, et lésions pléxiformes associées. CE : Cellule Endothéliale ; CML : Cellule de Muscle Lisse. (Adapté de Rabinovitch, 2012).

### 3.2.6 Traitements actuels

La pathobiologie de l'HTAP est complexe et implique de nombreux mécanismes, tels que le dysfonctionnement des cellules endothéliales (Giaid, 1993 ; Humbert, 2004 ; Guignabert, 2015), la prolifération des cellules musculaires lisses (Morell, 2001), l'inflammation vasculaire et le dérèglement immunitaire (Tamby, 2005 ; Humbert, 1995 ; Price, 2012 ; Perros, 2012), les anomalies métaboliques et mitochondriales (McMurty, 2004),



des défauts de canaux ioniques (Yuan, 1998 ; Antigny, 2016) et mutations de lignée germinale (Machado, 2001 ; Soubrier, 2013). Cependant, ces processus convergent pour produire une vasoconstriction excessive et un phénotype pro-prolifératif résistant à l'apoptose dans les cellules vasculaires pulmonaires. Les thérapies actuellement approuvées contre l'HTAP ciblent trois voies de signalisation principales qui jouent un rôle central dans le contrôle du tonus vasomoteur pulmonaire : les voies de la prostacycline, de l'endothéline 1 et de l'oxyde nitrique (NO). Ainsi à l'heure actuelle, la FDA a approuvé cinq classes d'agents ciblant ces trois voies, notamment les antagonistes du récepteur de l'endothéline 1 (bêta) (macitentan et ambrisentan), les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5 (PDE5) (sildénafil et tadalafil), des stimulateurs de guanylate cyclase soluble (riociguat); les analogues de prostacycline (époprosténol, tréprostinil et iloprost) et plus récemment, le sélexipag, un agoniste des récepteurs de la prostacycline IP (Edmund MT Lau, 2017).

### 3.2.2.1 Antagonistes du récepteur à l'endothéline 1

L'expression de l'endothéline 1 est régulée positivement chez les patients atteints d'HTAP et contribue à la vasoconstriction et prolifération des cellules de muscle lisse (Davie, 2002). L'endothéline 1 exerce ses effets sur deux sous-types de récepteurs : le récepteur A de l'endothéline (ETA) et le récepteur B de l'endothéline (ETB). Le récepteur ETA est fortement exprimé dans les cellules de muscle lisse des artères pulmonaires (PASM), alors que le récepteur ETB se trouve à la fois dans les PASM et les cellules endothéliales. Dans les cellules endothéliales, le récepteur ETB intervient dans la clairance locale de l'endothéline 1 et peut induire une vasodilatation via la libération de NO et de prostacycline (Hirata, 1993).

Le bosentan cible à la fois les récepteurs ETA et ETB et fut le premier antagoniste approuvé pour le traitement de l'HTAP (Rubin, 2002). Une fonction hépatique anormale est l'un des effets indésirables fréquents induits par ce médicament et peut survenir avec un risque de 10% (Humbert, 2004). Le dysfonctionnement hépatique induit par le bosentan est totalement réversible lors de l'arrêt du traitement.

L'ambrisentan cible sélectivement le récepteur ETA et a une demi-vie plus longue que celle du bosentan, ce qui permet une administration quotidienne. Contrairement au bosentan, l'ambrisentan n'est pas associé à un taux d'anomalies du test de la fonction hépatique supérieur à celui du placebo (Galie, 2005-2008). Malgré la sélectivité de l'ambrisentan pour

l'ETA, les données provenant d'essais en monothérapie n'indiquent pas de différence d'efficacité par rapport à la sélectivité des récepteurs (Humbert, 2014).

Le macitentan est le dernier antagoniste à avoir été approuvé pour les HTAP et, comme le bosentan, cible à la fois les récepteurs ETA et ETB. La structure chimique du macitentan est optimisée à partir du bosentan, qui permet une lipophilie élevée, une affinité accrue pour les récepteurs et une liaison prolongée aux récepteurs (Iglarz, 2008). Un essai de phase III a montré que les taux d'anomalies de la fonction hépatique et de rétention hydrique chez les patients atteints d'HTAP sous macitentan étaient similaires à ceux des patients traités par placebo, mais une incidence d'anémie plus élevée était associée au traitement par macitentan (Pulido, 2013).

### 3.2.2.2 Inhibiteurs de PDE5 (Phosphodiesterase de type 5)

Le GMPc est un second messager intracellulaire qui induit une relaxation des muscles lisses vasculaires, et dont sa dégradation est régulée par les enzymes phosphodiésterases (PDE). Le sous-type PDE5 est fortement exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires du poumon et les inhibiteurs de la PDE5 interagissent avec le domaine catalytique de cette enzyme et potentialisent les taux endogènes de GMPc en empêchant son hydrolyse (Rybalkin, 2003).

Le sildénafil a été le premier inhibiteur de la PDE5 approuvé pour le traitement de l'HTAP, et sa demi-vie relativement courte (4 à 6 h) nécessite une administration trois fois par jour (Galie, 2005). Le sildénafil est actuellement homologué pour utilisation dans l'HTAP à la dose de 20mg trois fois par jour. Une étude a montré une efficacité soutenue du sildénafil après 3 ans de traitement, mais à une dose non approuvée de 80 mg trois fois par jour (Rubin, 2011).

Le tadalafil est structurellement distinct du sildénafil, présentant ainsi des propriétés pharmacocinétiques différentes comme une demi-vie plus longue, ce qui permet une administration une fois par jour (Galie, 2009).

### 3.2.2.3 Stimulateurs de guanylate cyclase soluble

La guanylate cyclase soluble (sGC) est une enzyme catalytique qui génère du GMPc à partir de GTP (Stasch, 2001). Le NO active la sGC et augmente la production de GMPc. Les

stimulateurs de sGC stabilisent le complexe sGC – NO dans sa configuration active et peuvent également directement stimuler la sGC pour augmenter la production de GMPc, même en absence de NO (Stasch, 2011)

Le riociguat est le premier simulateur de sGC à avoir été mis au point. Il est approuvé pour le traitement de l'HTAP (Ghofrani, 2013 ; Humbert, 2017) et de l'hypertension pulmonaire thrombo-embolique chronique inopérable (Ghofrani, 2013). Ce médicament nécessite une augmentation progressive de la dose sur une période d'environ 8 semaines jusqu'à une dose d'entretien maximale de 2,5 mg trois fois par jour, en fonction de la pression artérielle systémique et des symptômes indésirables. L'hémoptysie est un effet indésirable rare associé à l'utilisation de riociguat (Ghofrani, 2013).

#### 3.2.2.4 Les analogues de prostacyclines

Les cellules endothéliales produisent de la prostacycline à partir de l'acide arachidonique via la prostacycline synthase (Oslchewski, 2001). La cible principale des prostanoïdes est le récepteur de la prostacycline, dont l'activation conduit à la production d'AMPc et à la vasodilatation (Coleman, 1994). La prostacycline a des effets antiprolifératifs, antiplaquettaires et immuno-modulateurs (Oslchewski, 2001).

L'époprosténol par voie intraveineuse a été le premier traitement approuvé pour l'HTAP. Il reste le seul traitement ayant démontré une amélioration de la survie à 12 semaines chez les patients atteints d'HTAP sévère (Barst, 1996). Ce médicament ne peut être administré que par perfusion continue via une ligne centrale, en raison de sa courte demi-vie (environ 2 à 3 min). L'époprosténol par voie intraveineuse est une thérapie complexe qui nécessite une éducation et une formation soignée du patient, ainsi que des soins infirmiers spécialisés et un soutien médical. L'époprosténol devrait être considéré comme la pierre angulaire du traitement des patients atteints d'HTAP grave (Sibton, 2014).

Le tréprostinil a une demi-vie plus longue et une stabilité chimique supérieure à celle de l'époprosténol. Il peut être administré par différentes voies, par voie intraveineuse, sous-cutanée, orale ou par inhalation. Le tréprostinil par voie orale et par inhalation est approuvé uniquement aux États-Unis pour le traitement de l'HTAP. Le tréprostinil par voie orale n'est homologué que pour les patients naïfs au traitement (Jing, 2013), et le tréprostinil par inhalation ne peut être utilisé que dans le cadre d'une thérapie combinée (McLaughlin, 2010).

Le tréprostinil par voie intraveineuse peut être utilisé chez les patients atteints d'HTAP qui ne tolèrent pas le traitement sous-cutané.

### 3.2.2.5 Agoniste du récepteur à la prostacycline (IP)

Le selexipag est un nouvel agent pharmacologiquement distinct des analogues des prostanoïdes et présente une sélectivité élevée pour le récepteur de la prostacycline IP (Asaki, 2015). Cette sélectivité réduit l'activation des récepteurs de prostanoïdes non ciblés et pourrait théoriquement réduire les effets indésirables associés au traitement par prostanoïdes. Le selexipag a été approuvé en 2015 par la FDA pour le traitement de l'HTAP à la suite de l'essai de phase III sur GRIPHON (Sitbon, 2015). Le selexipag est hydrolysé dans le foie en son principal métabolite actif, ACT-333679, possède une demi-vie d'environ 8 à 14 heures permettant une administration deux fois par jour. Les effets indésirables sont similaires à ceux associés au traitement par la prostacycline, notamment maux de tête, douleurs à la mâchoire, diarrhées, et nausées. En 2017, l'Agence européenne des médicaments (EMA) a examiné la sécurité du selexipag à la suite du signalement de cinq décès en France après l'instauration de ce médicament. La revue de pharmacovigilance de l'EMA a conclu que le selexipag n'augmentait pas la mortalité chez les patients atteints d'HTAP et que le taux de mortalité chez les patients traités par le selexipag était similaire à celui des patients traités avec d'autres médicaments contre l'HTAP. À l'heure actuelle, aucune mesure réglementaire spécifique n'a été jugée nécessaire et la sécurité de selexipag continuera d'être surveillée.

Tout comme HHT, on constate que les traitements actuels visent à traiter les symptômes notamment l'hypertension, sans pour autant traiter la voie BMP9 qui est déficiente.

### 3.2.7 Modèle animaux HTAP

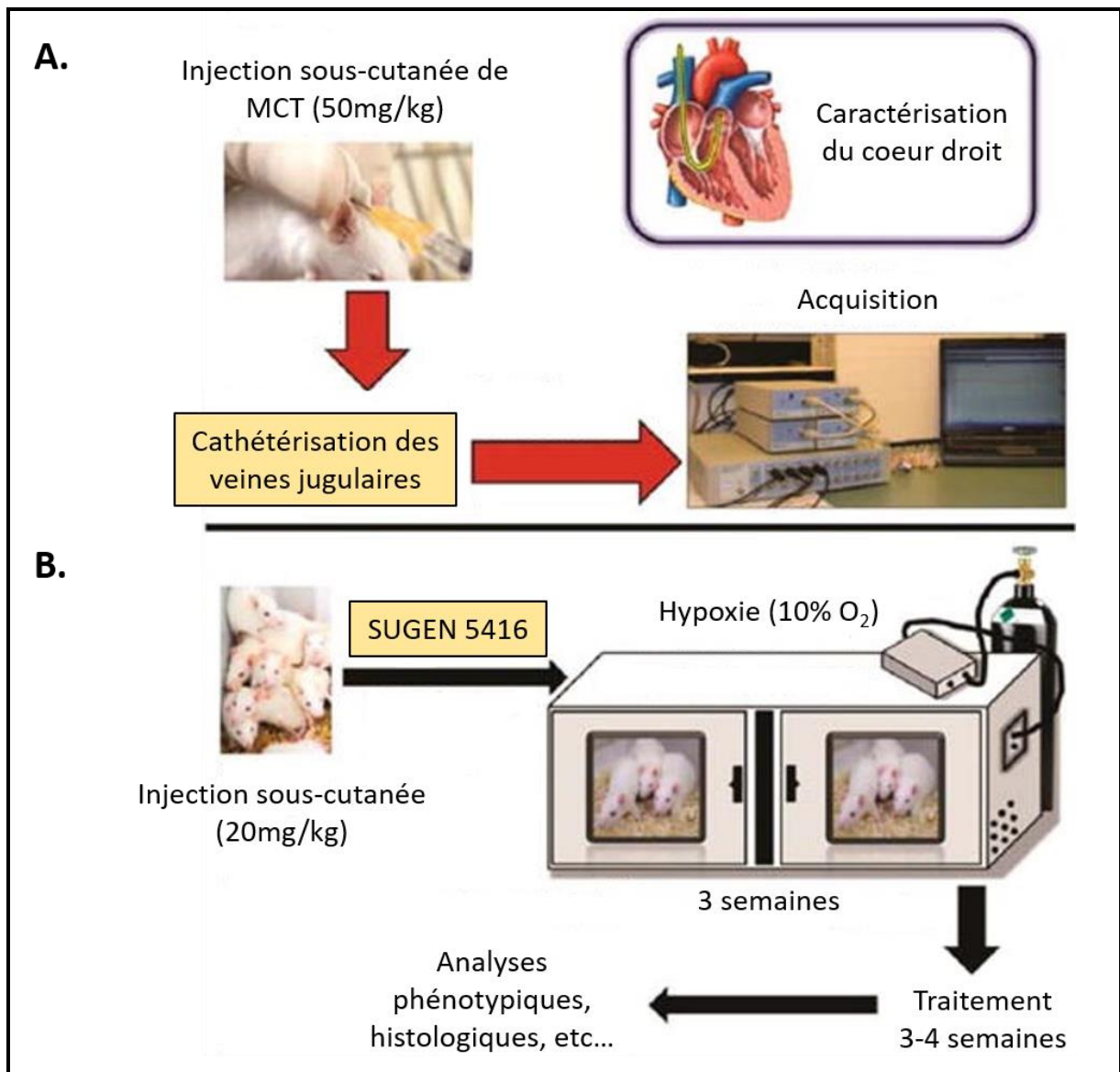
Afin de mimer le plus possible la pathologie, des souris *Bmpr2<sup>+/-</sup>* hétérozygotes ont été établies et étudiées pour caractériser l'HTAP (Beppu, 2004 ; Song, 2005 ; Long, 2006). Cependant ce modèle ne présentait pas de phénotype détectable. Ensuite, l'utilisation de shRNA dirigés contre *BMPR2* a été employé, induisant une diminution de l'expression de *BMPR2* de 80% mais ne présentant non plus des phénotypes HTAP (Liu, 2007). Puis, en

invalidant totalement *BMP2* dans les cellules endothéliales, il a pu être montré que des souris développaient une HTAP, cependant entre 2 et 7 mois (Hong, 2008).

Peu après ces recherches, il a été développé deux autres modèles permettant d'induire un phénotype HTAP sans altérer la génétique des souris, qui a rendu alors le travail plus rapide. Mais également complémentaire.

Le premier modèle développé fut sur des rats Wistar par injection sous-cutanée de Monocrotaline (MCT) à 50mg/kg pendant 28 jours. La MCT est un dérivé alcaloïde qui induit une irritation toxique dans les poumons, et plus particulièrement sur les cellules endothéliales (Gomez-Arroyo, 2011). Ces dommages ont également été montrés liés à une dysfonction de *BMP2* et à une mauvaise signalisation de la voie des BMPs, tout comme une rétention et une inhibition de l'activité *BMP2*. Les animaux développent un phénotype HTAP semblable aux HTAP sévères (Figure 22.A).

Ensuite, le modèle murin couplant Sugen5416/hypoxie (Vitali, 2014). Le Sugen 5416 inhibe l'activité de l'oxyde nitrique synthase neuronal et protège les cellules neuronales contre la neurotoxicité induite par l'oxyde nitrique. Il agit également comme un agoniste du récepteur des hydrocarbures aryliques et constitue un agent clinique efficace pour traiter les maladies auto-immunes et le rejet des greffes. Les animaux sont injectés par injection sous-cutanée de Sugen 5416 à 20mg/kg, puis placés dans un caisson hypoxique (10% O<sub>2</sub>) pendant 3 semaines. Les animaux peuvent être ensuite étudiés ou euthanasiés jusqu'à 10 semaines après traitement. Ainsi, ce modèle met en avant une pression systolique ventriculaire droite élevée et maintenue après retour en normoxie comparé au groupe contrôle, un épaissement des parois vasculaires pulmonaires ainsi qu'un nombre réduit d'artérioles pulmonaires perfusées, et l'apparition de lésions plexiformes. Ce modèle présente ainsi une pathobiologie semblable à une HTAP chronique (Figure 22.B).



**Figure 22 : modèles murins de l'HTAP.** (A.) : Modèle d'HTAP sévère induit par injection de Monocrotaline (MCT). (B.) : Modèle d'HTAP chronique par injection de SUGEN 5416 et hypoxie (adapté de Gupta N, 2018).

## 4 Criblage de chimiothèques en vue d'un traitement d'HHT et HTAP

### 4.1 Introduction au Criblage à Haut Débit et au repositionnement thérapeutique

Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, la découverte de nouvelles thérapies est l'un des axes de recherche les plus cruciaux dans la recherche biomédicale. Il a été de premier intérêt de développer des traitements sûrs pour soigner les maladies. Depuis que les découvertes intellectuelles de nouvelles molécules et l'accroissement des savoirs sur la physiologie moléculaire ne cessent de croître, les compagnies pharmaceutiques ont commencé à emmagasiner de grandes quantités de composés chimiques organisées en chimiothèques, comprenant en général entre 10 000 et 100 000 molécules (Macarron, 2011). Ensuite, dans les années 90, les compagnies commencèrent à cribler leurs chimiothèques dans le but de trouver de nouvelles thérapies pour les pathologies émergentes. Dans le but d'essayer de grandes quantités de molécules pour un seul test, le Criblage à Haut Débit (ou High Throughput Screening – HTS) a été développé. Ainsi, cette technique permettait de réaliser pas moins de 10 000 essais par semaine (Pereira et Williams, 2007). Cependant, les essais étaient principalement effectués en se focalisant sur des réactions enzymatiques, et plus tard extrapolés à des études de récepteurs cellulaires, comme les Récepteurs Couplés à des Protéines G (G-Protein Coupled Receptors – GPCRs) (Zheng, 2013). Grâce à l'augmentation des connaissances en biologie et physiopathologie, la recherche actuelle est passée à des essais plus phénotypiques, en prenant en compte le comportement et le métabolisme cellulaire. Ceci constitue un outil plus pertinent pouvant mettre en évidence des variations à la fois morphologiques, cytotoxiques ou métaboliques observables sur la cellule. Beaucoup de plateformes travaillent actuellement sur ces modèles, notamment en cancérologie ou infectiologie afin de trouver des traitements ayant un effet toxique pour certaines cellules (Barette, 2015). Cependant, trouver des molécules leader est un travail long et difficile avant de pouvoir proposer aux patients des thérapies potentielles, pouvant conduire à un développement d'au moins 10 ans (Macarron, 2011). En effet, les molécules leaders une fois découvertes doivent passer par les étapes d'identification de cibles et de validation, confirmation de l'effet obtenu et essais de toxicité (principalement sur des modèles cellulaires), une validation *in vivo* puis des essais cliniques, et enfin les approbations FDA/EMA (Food and Drugs Administration / European Medicines Agency) pour la mise sur le marché. La

plupart du temps, des modifications structurales sont requises pour améliorer la spécificité d'action du composé leader, pouvant ainsi considérablement allonger la caractérisation avant mise sur le marché. L'émergence du repositionnement thérapeutique accélère de manière considérable le processus de traitement des patients. En effet, le nombre de chimiothèques offrant de cribler des molécules approuvées par FDA/EMA et présent sur le marché pharmaceutique augmente considérablement, permettant de tester ces candidats à des concentrations connues pour certaines pathologies et avec des effets connus. Le repositionnement des médicaments est une stratégie efficace pour trouver de nouvelles fonctions pour les médicaments existants. Il est extrêmement efficace, peu coûteux et sans risque. Les stratégies traditionnelles de développement de médicaments comportent généralement cinq étapes : découverte et préclinique, examen de sécurité, recherche clinique, examen de la FDA/EMA et surveillance de la sécurité post-commercialisation de la FDA (Site officiel du Food & Drug Administration). Cependant, le repositionnement du médicament ne comporte que quatre étapes : identification du composé, acquisition du composé, surveillance de la sécurité post-commercialisation par la FDA/EMA. En raison de la croissance rapide des connaissances en bio-informatique et des « big data » en biologie, le repositionnement des médicaments réduit considérablement le coût en temps du processus de développement des médicaments. Les chercheurs n'ont besoin que de 1 à 2 ans pour identifier de nouvelles cibles médicamenteuses et de 8 ans pour développer un médicament repositionné, en moyenne. De plus, l'investissement en recherche et développement requis pour le repositionnement du médicament est inférieur à celui des stratégies traditionnelles. Le développement d'un nouveau médicament utilisant une stratégie de repositionnement ne coûte que 1,6 milliard de dollars, alors que le coût de la stratégie traditionnelle est de 12 milliards de dollars. Ainsi, le repositionnement d'un médicament offre à de nombreux pays la possibilité de développer des médicaments à moindre investissement (Xue, 2018).

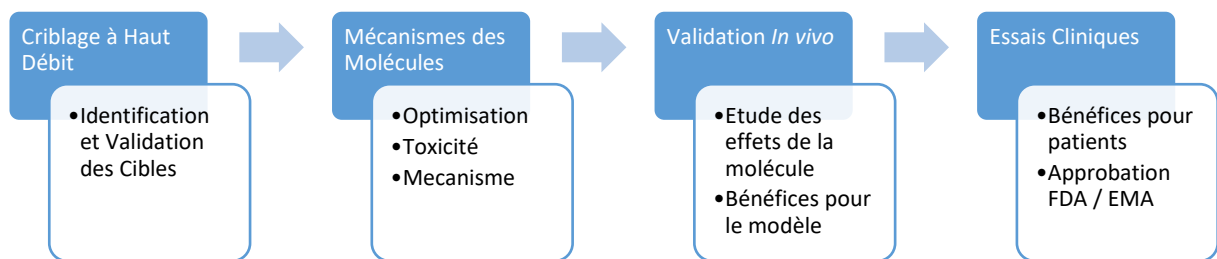
Certaines molécules connues ont déjà été repositionnées du fait de la découverte d'effets inattendus (Tableau 2). La plus connue est le Viagra® ou sildénafil. A la fin des années 1980, la molécule fut originalement développée pour traiter les angines de poitrines, apparaissant lorsque l'apport sanguin aux muscles cardiaques est amoindri. Cette molécule inhibe normalement la phosphodiesterase-5 (PDE5) afin de relaxer les muscles des artères coronaires. Il a cependant été montré des effets corrigeant la disfonction érectile pénienne



lors des essais cliniques, sur un essai de plus de 3700 hommes. Ainsi la molécule a été repositionnée et commercialisée sous le nom de Viagra, générant lors de sa première année un bénéfice de plus de 1.5 milliards de dollars (Renaud & Xuereb, 2002). Il existe aussi des repositionnements plus spectaculaires, comme le cas du Thalidomide, identifié comme présentant un fort risque biologique. En effet, dans les années 1950, le Thalidomide était utilisé comme agent sédatif, structuralement proche des barbituriques, pour traiter la nausée matinale chez les femmes enceintes. Les études menées sur les rongeurs n'ayant pas relevé de risques apparents, il était cependant néfaste chez l'embryon en développement, provoquant des malformations squelettiques chez 15000 nouveaux nés. La molécule fut alors retirée du marché, mais a prouvé cependant des effets bénéfiques dans les années 1960 lorsqu'utilisée sur des patients atteints d'érythème noueux lépreux, étape de la lèpre provoquant une inflammation cutanée et nerveuse. Le Thalidomide permettait alors aux patients de mieux dormir mais également de traiter les symptômes (Barratt & Frail, 2012) et générant grâce à son repositionnement un bénéfice de 200 millions de dollars par an. Cette molécule est également aujourd'hui utilisée en essai clinique pour le traitement de la maladie de Rendu-Osler comme décrit plus haut.

La recherche actuelle crible à présent ces bibliothèques moléculaires sur des essais *in vitro* pour investiguer de nouveaux mécanismes d'actions et propriétés pour ces molécules (Wilkinson et Pritchard, 2014). C'est par exemple le cas du dantrolène, relaxant musculaire utilisé aussi pour les chevaux, repositionné par criblage à haut débit. Bowden *et al* criblèrent une chimiothèque du NIH contenant 725 molécules approuvées par la FDA afin de trouver de nouvelles thérapies permettant d'inhiber la croissance d'un parasite équin, *Sarcocystis neurona*. Le criblage sortit 18 candidats potentiels, pour au final identifier le dantrolène comme candidat de choix, ayant un effet inhibiteur sur le parasite à de faibles concentrations et déjà développé pour les chevaux (Bowden, 2018). Les modèles cellulaires évoluent également, se dirigeant vers une médecine personnalisée en utilisant des cellules dérivées de patients pour le HTS, ainsi que des modèles plus pertinents quant au contexte physiopathologique comme l'usage des sphéroïdes dans les cribles pour le cancer (Coussens, 2017). De plus, le repositionnement moléculaire est crucial pour les maladies rares. De potentiels effets bénéfiques peuvent être rapidement essayés sur les patients souffrant de désordres incurables, là où de potentiels molécules leaders pourraient allonger leur espérance

de vie et améliorer leur vie quotidienne. Ainsi, les bénéfices que procure le repositionnement thérapeutique est d'importance majeure lorsque l'on considère l'avancée et le savoir sur la médecine moderne, la biologie actuelle et le challenge de trouver rapidement des traitements pour ces pathologies non traitées.



*Figure 23 : Diagramme schématique de la mise en place d'un traitement, de la découverte par criblage à haut débit jusqu'aux premiers essais cliniques et la mise sur le marché.*

Nom	Indication primaire	Indication nouvelle	Date d'approbation	Approches utilisées
<b>Zidovudine</b>	Cancer	VIH / SIDA	1987	Criblage in vitro de chimiothèques
<b>Minoxidil</b>	Hypertension	Alopécie	1988	Effets secondaires cliniques
<b>Sildenafil</b>	Angine	Dysfonction érectile	1998	Effets secondaires cliniques
<b>Thalidomide</b>	Nausée matinale	Erythème noueux lépreux	1998 et 2006	Analyses pharmacologiques
<b>Celecoxib</b>	Douleur et inflammation	Polypes adénomateux familiaux	2000	Analyses pharmacologiques
<b>Atomoxetine</b>	Maladie de Parkinson	Trouble de l'attention (ADHD)	2002	Analyses pharmacologiques
<b>Duloxetine</b>	Dépression	Incontinence urinaire de stress	2004	Analyses pharmacologiques
<b>Rituximab</b>	Cancer	Arthrite rhumatoïde	2006	Effets secondaires cliniques
<b>Raloxifène</b>	Ostéoporose	Cancer du sein	2007	Effets secondaires cliniques
<b>Fingolimod</b>	Rejet de transplantation	Sclérose en plaques	2010	Analyses pharmacologiques
<b>Dapoxetine</b>	Analgésie et dépression	Ejaculation précoce	2012	Analyses pharmacologiques
<b>Topiramate</b>	Epilepsie	Obésité	2012	Analyses pharmacologiques
<b>Ketoconazole</b>	Infections fongiques	Syndrôme de Cushing	2012	Analyses pharmacologiques
<b>Aspirine</b>	Analgésie	Cancer colorectal	2015	Effets secondaires

*Tableau 1 : Tableau présentant les succès notables en repositionnement thérapeutiques et leurs approches utilisées (adapté de Pushpakom et al., 2018).*

## 4.2 Criblage à Haut Débit dans HTAP et HHT

A cause du manque de traitements efficaces pour HTAP et HHT, il est urgent de trouver des candidats potentiels pouvant améliorer la qualité de vie des patients et à terme les guérir. Dans l'HTAP, les thérapies visent à vasodilater les artères pulmonaires afin de diminuer la pression artérielle pulmonaire (Sharma, 2016), alors que dans HHT les essais actuels réduisent les épistaxis mais pas les MAVs (Sommer, 2018). Cependant, la recherche actuelle s'efforce de trouver de nouvelles molécules innovantes pour restaurer la voie de signalisation BMP9.

Le criblage à haut débit dans le but de potentialiser cette signalisation déficiente a déjà été effectué pour ces deux pathologies. Pour ce faire, le choix de la lignée cellulaire est crucial, dans le but de proposer un modèle le plus proche possible du contexte physiopathologique. L'HTAP conduit à une vasoconstriction induite par les cellules de muscle lisse des artères pulmonaires (hPASMC) qui ont longtemps été considérées comme des acteurs clefs impliqués dans l'établissement de la maladie, ainsi les chercheurs ont d'abord utilisé des cellules proches de celles-ci : C2C12. Ces cellules sont des myoblastes de souris, sensibles à BMP9 et formant des ostéoblastes en réponse à celui-ci (Yamamoto, 1997). Cependant cette lignée pourrait ne pas être appropriée car la cascade signalétique pourrait être type cellulaire dépendant, ainsi un modèle endothélial serait plus adéquat compte tenu de la dysfonction endothéliale. Trouver l'endroit idéal de la voie de signalisation permettant de rapporter celle-ci est une étape clef lorsque l'on cherche des molécules potentialisant une réponse BMP9. La phosphorylation des Smads 1/5/8 est la réponse la plus directe au BMP9 et des autres BMPs. La méthode la plus simple, sensible et la plus quantitative existante aujourd'hui est la luciférase exprimée sous le contrôle d'un promoteur sensible aux Smads 1/5/8. Pour ce faire, Korchynskiy *et al.* ont développé une construction consistant en une séquence nucléotidique BMP/Smad-dépendante dérivée du promoteur d'ID1 (Inhibitor of Differentiation 1) qui a été fusionnée à un gène rapporteur codant pour une luciférase (Korchynskiy, 2002). En tant que gène de réponse précoce (Lee, 2009) *Id1* est transcrit de manière p-Smad 1/5 dépendante (Chen, 2006) et est ainsi utilisé communément pour rapporter la voie de signalisation des BMPs.

De ce fait, Zilberberg *et al.* ont généré une lignée stable C2C12 exprimant cette construction qui permet ainsi d'avoir un outil cellulaire de mesure de l'activité des BMPs à la

fois sensible et rapide (C2C21BRA) (Zilberberg, 2007). Cette lignée est donc un outil prêt à l'emploi pour les criblages à haut débit, qui accélère grandement les cribles de chimiothèques à grandes échelles sur des modèles cellulaires.

#### 4.2.5 Criblage sur C2C12BRA

Cette lignée cellulaire a été utilisée par deux groupes pour trouver de nouvelles molécules approuvées FDA actives sur HTAP et HHT. Spiekerkoetter E. et Ruiz S. ont criblé respectivement 3756 molécules approuvées FDA (NIH-CC, LOPAC, iomol ICCB KnownBioactives, Microsource Spectrum, Biomol FDA-approved drug library) et 700 molécules approuvées FDA (NIH Clinical, NCCs) sur les C2C12BRA (Spiekerkoetter, 2013 ; Ruiz, 2017). Le groupe de Spiekerkoetter a criblé des agents à capacité activatrice en absence ou présence d'une faible dose de ligand exogène (BMP4 250pM EC<sub>20</sub>). Les trois premiers hits obtenus étaient des agents immunosuppresseurs (Tacrolimus (FK506), Ascomycine et Rapamycine (sirolimus), dans l'ordre des effets potentialisateurs). Le groupe de Ruiz réalisa un crible similaire sur les C2C12BRA en présence cette fois de BMP9 (0.5ng/mL, EC<sub>50</sub>). De manière intéressante, la molécule ayant le plus haut potentiel activateur était également Tacrolimus. Conjointement, ces deux cribles identifient clairement le Tacrolimus comme activateur de la voie BMP9-Smad1/5/8. La façon dont le Tacrolimus active cette voie est cependant mal connue. Le Tacrolimus peut se lier à FKBP12 (FK506-binding-protein-12) connue pour interagir avec les récepteurs de type 1 de la famille TGF- $\beta$  au sein de leur domaine phosphorylé glycine-serine riche et bloquer leur activation. Il a été montré que le Tacrolimus dissocie FKBP12 des récepteurs ALK1, ALK2 et ALK3, et induit l'expression de BMPR2 et ALK1 (Spiekerkoetter, 2013 ; Albinana, 2011). Le Tacrolimus a été essayé sur différents modèles de souris et de rats représentatifs de l'HTAP et HHT. Ainsi le Tacrolimus réduit l'hypertension pulmonaire induite par une hypoxie chronique dans des souris *Bmpr2*<sup>-/-</sup> (modèle HTAP), et réduit également celle induite par des injections de monocrotaline chez les rats (modèle HTAP ; Gomez-Arroyo, 2011), le tacrolimus diminue également le nombre de MAVs rétiniennes induites par l'administration d'anticorps anti-BMP9/10 chez la souris (modèle HHT ; Ruiz, 2016). Ces travaux précliniques soutiennent le repositionnement du Tacrolimus dans HTAP et HHT. Un traitement à faible dose de Tacrolimus chez 3 patients en stade terminal d'HTAP pendant 12 mois a contribué à l'amélioration de certains symptômes et augmenté l'expression de BMPR2 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs)

(Spiekerkoetter, 2015). Ainsi un essai randomisé de tolérance et de sûreté contrôlé avec placebo a été effectué sur des patients HTAP. Cependant, malgré les changements observés, ceux-ci n'étaient pas significatifs (Spiekerkoetter, 2017). Un autre essai clinique en phase 1 est actuellement en cours cette fois-ci en utilisant de la Rapamycine (NCT02587325). De manière intéressante, le sirolimus a été donné après une transplantation hépatique chez un patient atteint HHT ayant eu de multiples MAVs, et il fut noté que les télangiectasies internes et externes, épistaxis et anémies ont disparus, suggérant que le mécanisme d'action du sirolimus implique une correction partielle de l'haploinsuffisance d'endogline et ALK1 (Skaro, 2006). Ceci a conduit à un essai clinique récent pour une administration nasale du Tacrolimus chez des patients HHT, qui vient juste d'être complété et en cours d'analyse (NCT0315201). De manière intéressante, le cas d'un patient souffrant à la fois d'HHT et HTAP a récemment été publié, montrant que le traitement à faible dose de Tacrolimus a amélioré les épistaxis dues à HHT mais n'a pas atténué la progression de l'HTAP (Sommer, 2018).

Suite aux résultats de leur criblage, Ruiz *et al.* ont poursuivi leurs recherches sur leurs autres candidats potentiels notamment le Sirolimus ou Rapamycine. Cette molécule, analogue du tacrolimus, est un agent immunosuppresseur et antiprolifératif en inhibant mTOR. Ainsi, en menant les mêmes études que pour le tacrolimus, ils ont pu observer que le sirolimus réduisait l'hypervascularisation et le nombre de MAVs dans la rétine du modèle murin HHT, inhibait la phosphorylation de S6 (directement modulée par mTOR) et de mTOR chez la souris et *in vitro* dans les HUVEC, et activait la phosphorylation des Smads 1/5/8 principalement par ALK2 (DATA non publiées, présentées au congrès HHT, Ruiz *et al.*, 2019).

#### 4.2.6 Cellules endothéliales dérivées de cellules souches embryonnaires humaine (hESC derived ECs)

Plus récemment, un criblage à haut débit a été réalisé cette fois ci en utilisant un modèle cellulaire endothélial, critique au développement de l'HTAP. Xing *et al.* (2018) ont choisi de cribler 31 composés identifiés dans un criblage précédemment effectué sur 8160 molécules capables de réguler l'expression de BMP2 (Li, 2009), provenant de bibliothèques moléculaires synthétiques et naturelles de l'Institut de Biotechnologie Médicale, Académie Chinoise des Sciences Médicales, Beijing, Chine. Ces molécules ont été testées sur un modèle original de cellules souches embryonnaires humaines (hESC), transfectées de manière stable avec une construction ID1-VenusLuc-MC1-DTA, dans laquelle on trouve une protéine

fluorescente verte Venus (permettant le marquage des cellules), une luciférase de luciole dirigée par un promoteur entier d'*Id1* humain ainsi que des gènes Metacaspase 1 (MC1) et diphtheria toxin A utilisé pour l'édition de gène en recombinaison homologue. Puis les cellules sont différenciées en cellules endothéliales (ECs). Cette construction a l'avantage de tester des molécules sur un promoteur physiologique. Parmi les 31 candidats identifiés comme capables d'induire l'expression de BMP2, Xing *et al.* ont mis en lumière une piperidine, appelée BMP Upregulator (BUR1) augmentant l'expression d'ID1. Leur travail a ainsi montré une expression augmentée précoce pour ID1 en concordance avec une phosphorylation des Smads1/5 en présence de BUR1 seule. De manière surprenante, une action conjointe de BMP9 et BUR1 montre une phosphorylation des Smads1/5 supérieure à celle induite par BMP9 seule, intéressante pour potentialiser une réponse BMP9 réduite due aux mutations hétérozygotes de BMPR2 et ALK1 dans HTAP et HHT. BUR1 a également montré ses effets bénéfiques en regard de l'HTAP, en montrant une hausse de l'expression de BMP2, BMPR2 et PTGS2. Concernant la physiopathologie, BUR1 protège contre l'HTAP déclenchée par injection de monocrotaline et prévient le remodelage vasculaire chez le rat. Même si BUR1 nécessite aujourd'hui davantage de caractérisation avant d'être proposé en essai clinique, ces travaux montrent tout de même une importance de cette nouvelle molécule pour traiter l'HTAP, avec un repositionnement thérapeutique compte tenu de l'effet proposé par Li X. *et al.* sur l'expression de BMPR2. L'outil de criblage ainsi proposé par Xing *et al.* semble donc être judicieux en considérant la dysfonction endothéliale observée dans ces pathologies, et constitue aujourd'hui la première lignée endothéliale proposée pour cribler des chimiothèques, et rapportant la voie BMP9.

#### 4.2.7 Criblage phénotypique

Parmi les modèles existants, il est également intéressant de travailler sur des cellules issues directement de patients afin de se situer dans un réel contexte physiopathologique. Satoh *et al.* (2018) ont ainsi effectué des cribles phénotypiques sur des cellules de muscles lisses artériels pulmonaires (hPASMC) provenant de patients non atteints de HTAP. Leur but était de sur-exprimer dans les cellules deux acteurs moléculaires connus dans l'HTAP :

- Cyclophiline A (CypA), induisant la prolifération des cellules de muscles lisses, l'inflammation (Satoh Kimio, 2008) et la thrombose (Elvers, 2012).

- Basigine (BSG), récepteur extracellulaire de CypA (Yurchenko, 2002)

Ainsi, leur crible vise principalement à empêcher la prolifération des cellules, en cherchant des inhibiteurs de ces 2 molécules. Ceci leur a permis d'identifier le Celestrol (anti-oxydant) comme meilleur candidat, permettant de réduire le morhpotype allongé des cellules issues de patients et donnant alors un morphotype semblable aux cellules contrôles. Cette équipe a mis en place un autre système de crible sur ces hPASC. Ils ont tout d'abord effectué des biopsies de poumons à la fois de patients non HTAP et HTAP pour récupérer et cultiver les hPASC, puis ont effectué des microarray d'expression génique à haut débit. Ceci a pour but d'identifier les éventuels acteurs moléculaires dérégulés dans l'HTAP par rapport à une condition physiologique. Ce faisant, ils ont identifié la Selenoprotéine P (SeP) comme étant sur-exprimée chez les patients HTAP. SeP promeut la prolifération des PASC. Satoh *et al.* ont donc initié le travail de criblage phénotypique établi précédemment, afin de trouver des inhibiteurs de SeP dans l'HTAP, et proposent par ailleurs cette protéine comme marqueur de HTAP.

Molécules candidates	Cibles	Lignées Cellulaires	Pathologies	Références
FK506 (tacrolimus)	Smad1/5 – MAPK ID1	C2C12BRA	HTAP	Spiekerkoetter E. <i>et al</i> , 2013
FK506 (tacrolimus)	Smad1/5 – DII4 Akt – p38	C2C12BRA	HHT	Ruiz S. <i>et al</i> , 2017
BUR1	ID1 – BMPR2 PTGS2	hESC derived ECs	HTAP	Xing Y. <i>et al</i> , 2018
Celastrol	CyPA – Bsg	PASCs	HTAP	Satoh K. <i>et al</i> , 2018
Enzastaurin	BMPR2 – FHIT	mMyoblastoma	HTAP	Prosseda SD. <i>et al</i> , 2018

Tableau 3 : Récapitulatif des criblages à haut débit effectués dans HTAP et HHT.



## Objectifs

L'équipe du Dr. Bailly dans laquelle j'ai effectué ma thèse possède une expertise sur les différents rôles physiologiques et pathologiques de BMP9 et BMP10. En 2007, l'équipe a pu démontrer que le récepteur préférentiel de BMP9 et BMP10 était le récepteur de type 1 ALK1 (David, 2007) et que cette voie de signalisation permettait la quiescence des vaisseaux sanguins (David, 2008). Ainsi BMP9 et BMP10 jouent un rôle crucial dans le maintien d'une homéostasie endothéliale vasculaire. Comme la voie BMP9 a été montrée comme dérégulée dans la maladie de Rendu-Osler et l'Hypertension Artérielle Pulmonaire, Il est nécessaire aujourd'hui de trouver de nouvelles thérapies permettant de restaurer cette voie de signalisation dans ces contextes pathologiques.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier de nouveaux candidats permettant de soigner ces deux pathologies. S'agissant de pathologies rares pour lesquelles les industries pharmaceutiques ne développent pas aujourd'hui de nouveaux composés rentables et, pour notre laboratoire travaillant en milieu académique, le choix de la stratégie s'est porté sur le repositionnement thérapeutique. Ainsi, en collaboration Marie-Odile Fauvarque et Caroline Barette de la plateforme de criblage CMBA du CEA (Barette, 2015), nous avons pu développer des outils cellulaires représentatifs de ces pathologies, à savoir des cellules endothéliales, pour cribler des molécules approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) et European Medicines Agency (EMA) en criblage à haut débit.

Ma thèse s'est déroulée en 3 parties: (A) Développer un modèle cellulaire endothélial permettant de rapporter la voie BMP9, afin de découvrir des candidats potentiels activant la voie BMP9 seule ou potentialisant une la réponse biologique à de faibles doses de BMP9, (B) adapter le modèle cellulaire pour un criblage à haut débit et réaliser les cribles de molécules provenant de chimiothèques Prestwick et TargetMol, et enfin (C) caractériser les molécules sorties positives du criblage afin de comprendre leur mécanisme d'action sur la voie BMP9.

## Résultats

### 1. Développement d'un test cellulaire rapportant la voie de signalisation BMP9-ALK1-SMAD1/5

#### 1.1 Choix du modèle cellulaire

Les pathologies HTAP et HHT résultent d'une dysfonction endothéliale. Celle-ci est due à des mutations de la voie de signalisation BMP9, à savoir BMPR2 principalement pour HTAP et ALK1 (Récepteur de haute affinité pour BMP9 – David L., 2007) ou ENG pour HHT, comme expliqué précédemment. Il est ainsi judicieux d'élaborer un modèle endothélial, plus représentatif des deux pathologies étudiées. Par ailleurs, les cellules endothéliales vasculaires sont les seules à exprimer ALK1, considéré comme un marqueur endothélial, et expriment fortement BMPR2. Comme cité plus haut, les criblages actuels utilisent la lignée C2C12BRA établie par Zilberberg *et al.* (2007), clone cellulaire exprimant de manière stable une luciférase contrôlée par un promoteur ayant une séquence BRE sensible aux BMPs. Les C2C12 étant des cellules myoblastiques, il est intéressant de les utiliser en regard de l'HTAP, cependant ces cellules n'expriment que ALK2, un peu d'ALK3, et les récepteurs de type 2 BMPR2, ActR2A et ActR2B (Zilberberg, 2007). Malgré les résultats apportés par les criblages utilisant cette lignée, il est plus original et pertinent de proposer un modèle de cellules endothéliales.

Ainsi nous avons choisi de développer une lignée stable endothéliale rapportant la voie BMP9. Le choix de la lignée endothéliale s'est porté sur les HMEC-1 (ATCC® CRL-3243™ ; cellules endothéliales microvasculaires du derme humain immortalisées). En effet, des étapes de transfections et infections sont nécessaires à l'insertion du gène codant la luciférase dans le génome de la cellule. Comme la lignée est immortalisée par l'antigène T du virus SV40, celle-ci résiste mieux aux étapes d'infection/transfection que des cultures primaires comme les HUVECs (Cellules endothéliales primaires de veines ombilicales humaines).

#### 1.2 Choix du mode de lecture

Pour rapporter la voie BMP9, il existe plusieurs techniques qui peuvent être adaptées pour un criblage à haut débit. Cette cascade de signalisation est directe, et conduit en premier lieu à la phosphorylation des Smad1/5. Le Western Blot étant trop compliqué à mettre en

place pour un criblage à haut débit et par ailleurs non adapté car non quantitatif, nous avons choisi d'essayer une technique proposée par Cisbio utilisant l'HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence). Cette technique basée sur le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) consiste en deux fluorophores, un donneur recevant une énergie à une longueur d'onde de 330nm, excitant le receveur qui émet sur une longueur d'onde de 665nm (celle mesurée par le lecteur). Dans notre système, les deux fluorophores interagissent lorsqu'ils sont liés au p-Smad1/5. Cependant cette technique n'a pas donné de résultats concluants (peu sensible, difficile et long à mettre en place), nous avons choisi de rapporter la voie BMP9 au niveau de l'expression génique.

Il est possible de mettre en place un système permettant de rapporter l'expression des gènes cibles de la voie BMP9, comme ID1 ou Smad6. Il existe des outils de RT-qPCR permettant de réaliser un criblage de molécules induisant une induction ou inhibition d'expression de gènes ciblés (J.A Bittker, 2012). Cependant ceci nécessite un équipement adapté permettant d'effectuer l'expérience en plaque 384 ou 1536 puits pour gagner du temps. Une plaque 96 puits prenant déjà 1 à 1h30min de qPCR. Il ne nous a donc pas été possible de développer cette technique. Cependant un crible secondaire visant à regarder la modulation de l'expression d'ID1 serait envisageable.

Aussi nous avons opté pour une méthode déjà existante. Korchynskyi *et al.* ont développé un plasmide pGL3 BRE-Luc comprenant une luciférase (Luc) contrôlée par un promoteur possédant un élément de réponse aux BMPs (BRE) consistant en une séquence courte du promoteur ID1 dupliquée et fusionnée pour augmenter la sensibilité de réponse. Ainsi, le système cellulaire synthétise de la luciférase en réponse au BMP9, qui peut être quantifiée au luminomètre. Nous utilisons ici deux types de luciférase : la Luciférase Firefly (luciole) exprimée dans le pGL3, dégradant la Luciférine et produisant de la lumière (le plus utilisé) ; et la Luciférase Renilla, dégradant la coéluentérazine et produisant de la lumière également. Dans les HMEC-1, nous avons choisi d'exprimer une troisième sorte de luciférase, la *Metridia* Luciférase, ayant la particularité d'être sécrétée par la cellule, et qui utilise le même substrat que la Luciférase Renilla. Pour établir une lignée stable exprimant la *Metridia* Luciférase sous contrôle du promoteur BRE, j'ai utilisé un plasmide lentiviral pLVX proposé par Clontech afin de générer des particules lentivirales qui serviront à infecter la lignée stable HMEC-1. Ce plasmide ne répond toutefois pas aux BMPs. Il possède un Site de Clonage

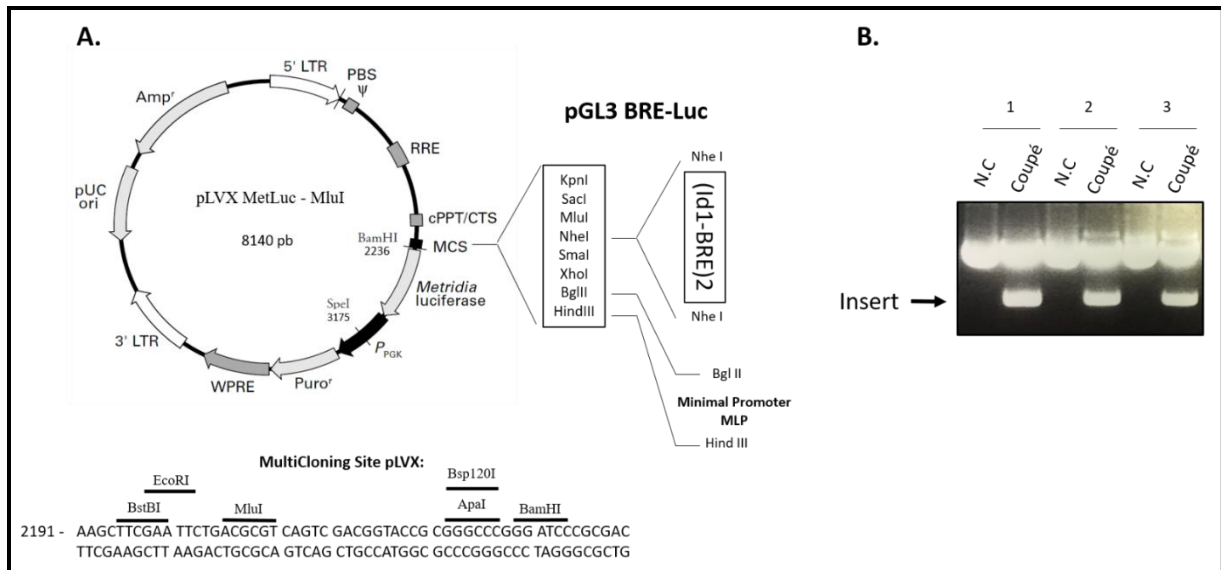
Multiple (MCS) permettant l'insertion d'une séquence BRE que j'ai excisé à partir du plasmide pGL3 BRE Luc. Ce choix permet de visualiser une activité luciférase dans les surnageants de culture mais également de ne pas lyser les cellules pour des caractérisations ultérieures (par exemple Western Blots de p-Smad 1/5, RT-qPCR, etc...).

### 1.3 Mise au point du test de criblage en 96 puits au robot

Dans la problématique des deux pathologies HHT et HTAP, nous avons choisi d'établir un modèle stable de cellules endothéliales rapportant la voie BMP9/ALK1/BMP2/SMAD1-5. Pour ce faire, j'ai utilisé un plasmide lentiviral pLVX MetLuc de Clontech, codant pour une *Metridia* Luciférase ayant la particularité d'être sécrétée hors de la cellule (ce qui me permettra de détecter une activité luciférase en prélevant du surnageant de culture), et qui pourra infecter les cellules d'intérêt pour établir une lignée stable (Figure 24).

#### 1.3.1 Sous Clonage BRE

J'ai d'abord excisé une séquence Id1-BRE-MLP (séquence ID1-BRE<sub>2</sub> et promoteur minimal (MLP)) provenant d'un plasmide pGL3 BRE-Luc initialement développé par Korchynski et placé en amont de la *Metridia* luciférase dans un site de clonage multiple. Les plasmides sont ensuite amplifiés dans les bactéries *E.Coli* DH5- $\alpha$ , purifiés puis séquencés afin de vérifier la séquence du plasmide.

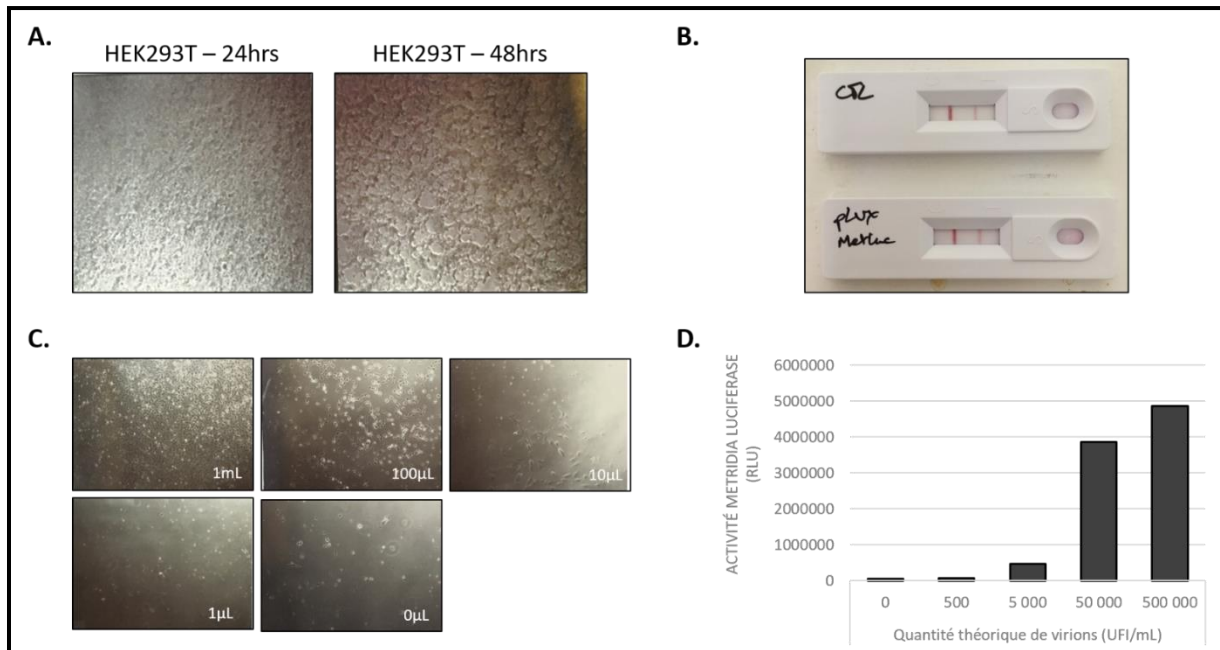


**Figure 24: Création d'un plasmide pLVX rapportant une activité Metridia Luciférase sécrétée dépendante de la voie Smad 1/5.** (A.) : Une séquence MluI a été insérée par mutagenèse dirigée dans le plasmide d'origine pLVX MetLuc de Clontech pour faciliter l'insertion de la séquence (Id1-BRE)2 et du promoteur minimal MLP dans un site de clonage multiple (dont la séquence est présentée sous le plasmide). (B.) : Gel d'agarose 1% présentant les plasmides isolés de clones bactériens d'E.Coli DH5- $\alpha$ , coupés ou non par les enzymes de restriction BamHI / SpeI.

### 1.3.2 Etablissement de la lignée stable HMEC BRE MetLuc

Dans un premier temps, les plasmides ont été transfectés dans des cellules HEK293T en p100 pendant 48h afin de produire des virions. Au bout des 48h, des plages de lyse sont observables et nous pouvons prélever du surnageant de culture contenant les virions formés (Figure 25.A). Clontech propose un système de titrage afin d'évaluer le nombre d'unités infectieuses (Figure 25.B). Il s'agit en fait d'un test rapide effectuable en 10 minutes, consistant en une languette présentant des anticorps anti-p24, permettant de détecter la protéine p24 de la capsidie lentivirale, codée par le gène *gag*. On y dépose 20 $\mu$ L de surnageant sur la fente indiquée, puis on y ajoute une solution saline pour faire migrer l'échantillon sur la languette. Une coloration rouge apparaît alors s'il y a des virions, correspondant approximativement à une quantité de 5.10<sup>5</sup> Unités Fonctionnelles Infectieuses (UFI) par millilitre, pouvant être dosable par ELISA ensuite. Nous avons donc dans nos boîtes de Pétri une quantité virale d'environ 5.10<sup>5</sup> UFI/mL de surnageant. J'ai donc infecté des cellules HMEC-1 avec différentes concentrations virales (5.10<sup>5</sup>, 5.10<sup>4</sup>, 5.10<sup>3</sup>, 5.10<sup>2</sup>, 5.10<sup>1</sup> et 5 UFI/mL) pendant 24h, puis j'ai rajouté du milieu de culture pendant 48h (Figure 25.C). J'ai ensuite sélectionné les cellules pLVX-MetLuc positives en présence de puromycine à 0.6 $\mu$ g/mL (dose maximale tolérée par les

HMEC-1) et entretenu les cellules en culture. Les HMEC-1 ayant reçu 5 et 50 UFI/mL de virus ont difficilement poussé et n'ont pas survécu, alors qu'en présence de  $5 \cdot 10^4$  et  $5 \cdot 10^5$  UFI/mL elles ont bien poussé et sécrètent de la luciférase en réponse aux BMPs présentes dans le Sérum de Veau Fœtal du milieu de culture (Figure 25.D). Cependant je n'ai pas pu isoler un clone afin de l'amplifier, en effet ces cellules poussent difficilement une fois isolées. Nous avons donc travaillé avec un pool de cellules à activité pLVX MetLuc.



**Figure 25: Etablissement de la lignée cellulaire HMEC – MetLuc.** (A.) : Les cellules HEK293T sont transfectées par les plasmides pLVX MetLuc, où l'on constate l'apparition de plages de lyses à partir de 48h de transfection. (B.) : Procédé d'utilisation du kit GoStix proposé par Clontech. 20μL de surnageant est prélevé dans les boîtes de HEK293T et déposé dans la fente de dépôt de la languette GoStix. La migration s'effectue grâce à l'ajout de 4 gouttes d'une solution tampon qui pousse le surnageant dans la languette. Ici, un plasmide pLVX Contrôle et notre construction pLVX MetLuc ont été testés donnant une quantité virale approximative de  $5 \cdot 10^5$  UFI/mL. (C.) : Différentes concentrations en virions ont été déposées sur les HMEC-1 (1mL =  $5 \cdot 10^5$  UFI/mL ; 100μL =  $5 \cdot 10^4$  UFI/mL ; etc...) pendant 24h, puis traitées 48h à la puromycine 0.6μg/mL. (D.) : Activité Metridia Luciférase en réponse au Sérum de Veau Fœtal (SVF10%) du milieu de culture provenant des surnageants des puits d'essai d'infection (en simplicat, n=1) (C.)

### 1.3.3 Validation de la réponse BMP9 chez les cellules HMEC – MetLuc

Dans un premier temps, j'ai évalué l'activité de la *Metridia* Luciférase en réponse à une gamme de BMP9 (Figure 26.A). On constate un début de réponse pour de faibles doses de BMP9 de 3pg/mL et un plateau de réponse à partir de 1ng/mL, donnant une  $EC_{50}$  d'environ

500pg/mL (Tableau 4). Cependant, il est intéressant de noter que le modèle HMEC-1 pGL3 BRE Luc que j'ai également développé donne une EC<sub>50</sub> plus faible, de l'ordre de 50pg/mL que je décrirai plus loin. Le modèle HMEC-MetLuc semble alors moins sensible. A l'instar d'une transfection transitoire, le modèle HMEC-MetLuc ne permet pas d'utiliser une luciférase normalisatrice (comme le plasmide TK-Renilla). Aussi, comme les cellules sont viables puisque non lysées, il est possible de les quantifier au WST-1 (Sel de tetrazolium clivé à la surface cellulaire produisant du formazan, dont le mécanisme de réduction dépend du NADPH intracellulaire). Il est donc possible de récupérer les surnageants puis de quantifier la viabilité cellulaire au WST-1 lu en absorbance à 450nm pour normaliser le signal luciférase au nombre de cellules.

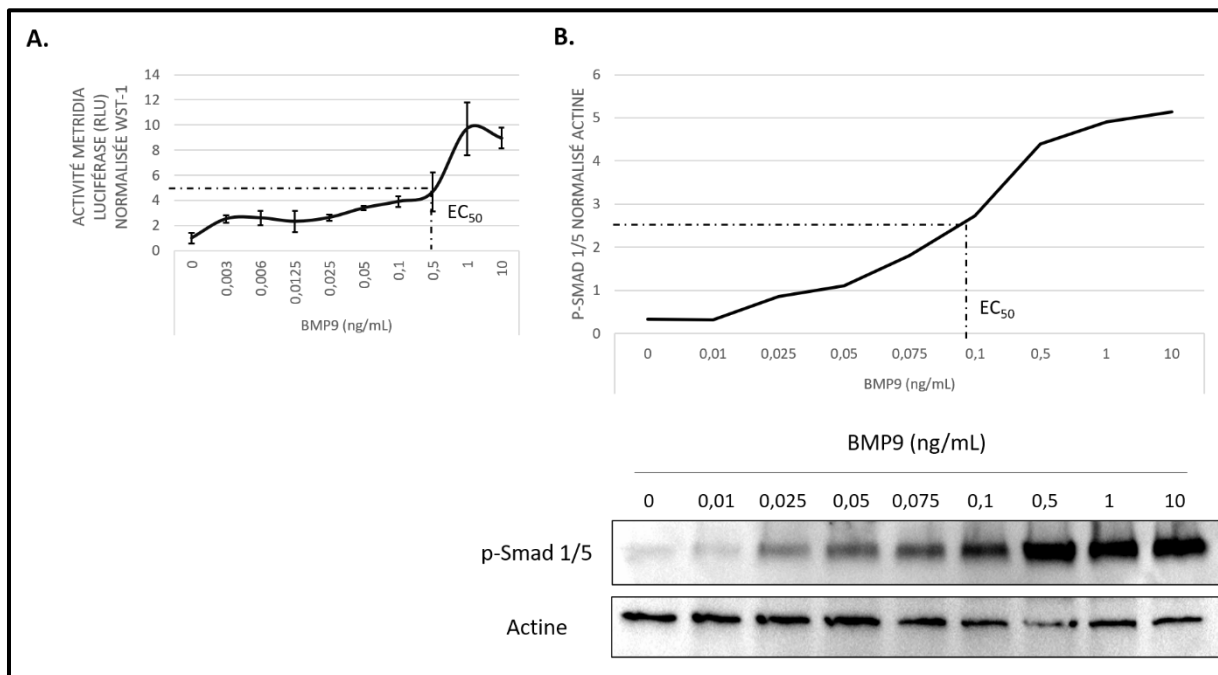
Comme BMP9 induit une phosphorylation précoce des Smads 1/5, j'ai cherché à savoir si le modèle nouvellement établi conservait cette phosphorylation, et également d'évaluer un lien entre dose-réponse de BMP9 sur la phosphorylation des Smads et sur l'expression de la *Metridia* Luciférase. J'ai stimulé les HMEC-MetLuc par une gamme de BMP9 et ai évalué la phosphorylation des Smads 1/5 en réponse à celle-ci. On constate un début de phosphorylation à partir de 25pg/mL de BMP9, puis on atteint un plateau à partir de 500pg/mL. Ceci présente un EC<sub>50</sub> se situant aux alentours de 100pg/mL, montrant que la phosphorylation des Smads 1/5 serait plus sensible que l'activité *Metridia* Luciférase.

J'ai souhaité ensuite approfondir la caractérisation de la réponse BMP9 et du modèle HMEC-MetLuc. J'ai d'abord voulu connaître les niveaux d'expression des récepteurs de type 1 des BMPs, à savoir ALK1, ALK2 et ALK3. Pour ce faire, j'ai effectué une RT-qPCR sur des HMEC-MetLuc non stimulées (Figure 27). On constate ainsi que ces cellules expriment en quantité équivalente les récepteurs ALK1 et ALK2, récepteurs de type 1 de haute affinité de BMP9 et BMP10, et également en plus grande quantité ALK3.

Ensuite, j'ai cherché à confirmer la spécificité des récepteurs sur l'activité de la *Metridia* Luciférase, et voir quel récepteur répond à BMP9. J'ai donc utilisé des siARN afin d'atténuer l'efficacité des récepteurs dans les HMEC-MetLuc, en diminuant l'expression d'ALK1, ALK2 et ALK3, puis en stimulant les cellules par du BMP9 (10ng/mL). Lorsque l'expression d'ALK1 ou ALK2 est diminuée (PCR non montrées), on constate que l'activité luciférase diminue respectivement de 90 et 80% par rapport à la condition contrôle (siSCR) en réponse à BMP9. De manière surprenante, une forte dose de BMP9 (10ng/mL) est capable

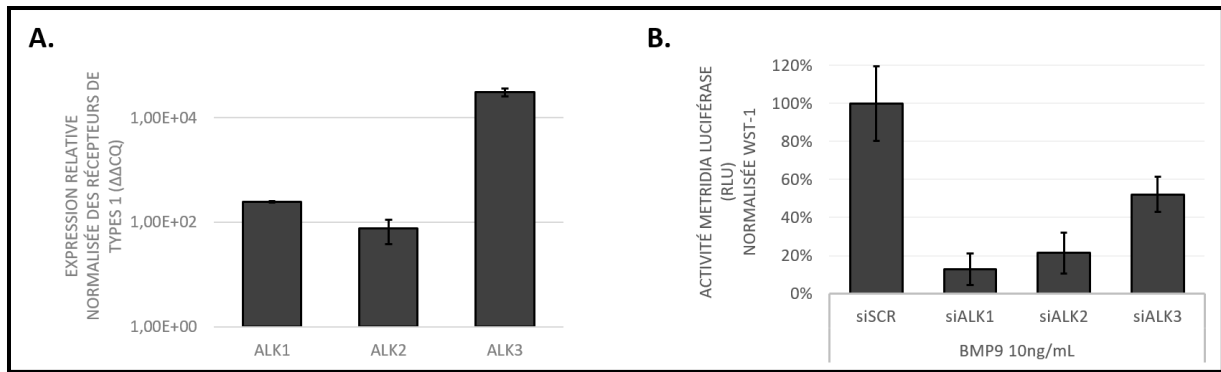
d'emprunter ALK3 afin de produire une activité luciférase, en effet l'activité est réduite de 50% avec un siALK3. J'ai également fait des Western Blot comparatifs entre HMEC-1 et HMEC-MetLuc en regardant la phosphorylation des Smads 1/5 en réponse à BMP9 (ALK1, ALK2) et BMP4 (ALK3) (Figure 28). On constate conjointement avec les EC<sub>50</sub> décrits précédemment que l'intensité de phosphorylation est diminuée dans le modèle cellulaire établi. Cependant ce modèle reste fonctionnel et sensible pour répondre à BMP9 dans le criblage à haut débit.

Ces résultats nous présentent donc que le modèle cellulaire établi HMEC-MetLuc rapporte bien la voie BMP9 en passant par ALK1 et ALK2 principalement ainsi que la phosphorylation des Smads 1/5.

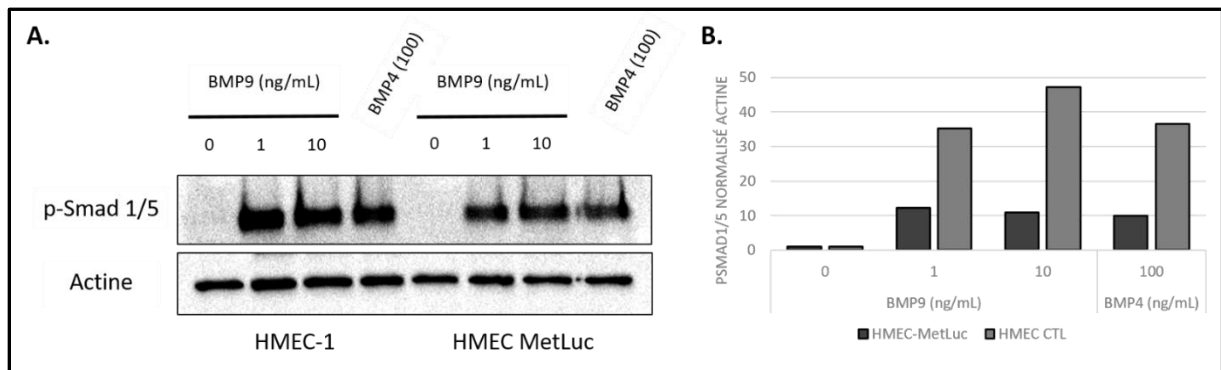


**Figure 26 : Caractérisation des réponses de la voie BMP9 dans le modèle HMEC-MetLuc. (A.) : Activité de la Metridia Luciférase en réponse à une dose croissante de BMP9 sur une nuit, en unités relatives de luminescence (RLU) normalisées au WST-1 (en triplicat, n=1). (B.) : Western Blot de p-Smad 1/5 en HMEC-MetLuc en réponse à une dose croissante de BMP9 (en ng/mL) pendant 2hrs, avec quantification en haut et photographie des western blots associées en dessous (en simplicat).**





**Figure 27 : Caractérisation de la lignée HMEC-MetLuc.**(A.) : Expression relative endogène des récepteurs de type 1 ALK1, ALK2 et ALK3 dans les cellules HMEC-MetLuc, normalisée HPRT (en duplicat, n=1). (B.) : Activité Metridia Luciférase des HMEC-MetLuc transfectées siSCR, siALK1, siALK2 ou siALK3 en réponse à BMP9 10ng/mL, en pourcentage d'activation du BRE quantifiée en unités relatives de luminescence (RLU), et normalisée au WST-1 (en duplicat, n=1).



**Figure 28: Différence de réponse entre HMEC-1 et HMEC-MetLuc.** (A.) Western Blot p-Smad1/5 en réponse à différentes doses de BMP9 et BMP4 (en ng/mL) en HMEC-1 (à gauche) et HMEC-MetLuc (à droite), et (B.) graphique quantitatif des réponses p-Smad1/5 normalisées Actine (en simplicité, n=1).

	EC50 Western Blot	EC50 Luciférase
<b>HMEC – MetLuc</b>	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL
<b>HMEC – FR Luc</b>	0.05 ng/mL	0.05 ng/mL
<b>C2C12BRA</b>	5 ng/mL	10 ng/mL

**Tableau 4 : EC50 des différentes lignées utilisées pour le criblage, en Western Blot et Luciférase, stimulées par une gamme de BMP9.**

### 1.3.4 Robustesse du Test

Avant d'effectuer un criblage, il est nécessaire d'évaluer la robustesse du test développé. Pour ce faire, Zhang *et al.* ont établi un facteur statistique permettant de

déterminer la force du test, appelé Z' Factor. Ce dernier compare 30 points considérés comme contrôles négatifs du test contre 30 considérés comme contrôles positifs du test, et tient compte des écarts-types et moyennes de ces valeurs. Il peut être calculé par la formule suivante :

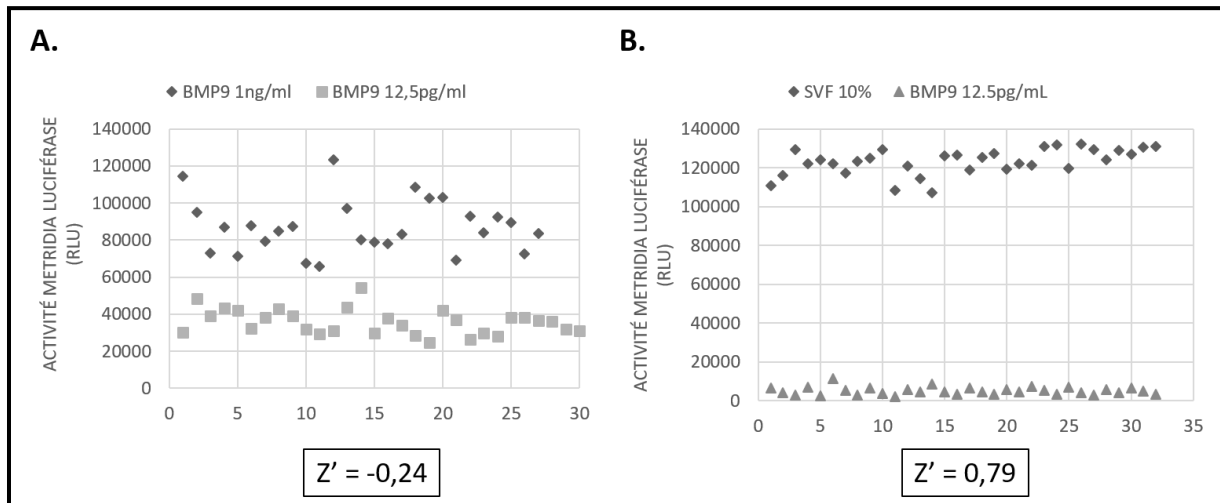
$$Z' Factor = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

Dans laquelle nous aurons :

- $\sigma_p$  = écart-type des contrôles positifs
- $\sigma_n$  = écart-type des contrôles négatifs
- $\mu_p$  = moyenne des contrôles positifs
- $\mu_n$  = moyenne des contrôles négatifs

Pour que le criblage puisse être effectué dans de bonnes conditions, le facteur Z' doit être compris entre 0.5 et 1. Dans notre test, nous avons choisi de traiter les cellules avec une concentration minimale de BMP9 suffisante pour activer la voie étudiée et permettant aux molécules testées de potentialiser cet effet, à savoir 12.5pg/mL, qui sera donc notre contrôle négatif. Ensuite, nous avons choisi le contrôle positif comme étant la première réponse maximale strictement ALK1 dépendante (dans le cadre de la problématique HHT) à savoir BMP9 1ng/mL, étant également la première valeur du plateau de réponse. Cependant, dans ces conditions nous avons constaté une induction du signal trop faible et une variabilité inter-puits trop importante pour nous permettre d'obtenir un Facteur Z' satisfaisant. Nous avons constaté précédemment que le sérum de veau fœtal nous donnait des inductions de signal plus importante que le BMP9 seul, probablement dû aux différentes BMPs contenues dans celui-ci. En effet, le signal n'est induit que de 4 fois avec BMP9 1ng/mL, le SVF 10% nous permettant d'atteindre une induction de 17 fois par rapport à BMP 12.5pg/mL (Figure 29.A). Donc, en utilisant le SVF comme contrôle positif, on considère que l'on obtient la réponse maximale que le système BRE *Metridia* luciférase peut donner. Ceci ne modifiant pas l'intérêt de trouver des molécules potentialisant une réponse faible de BMP9 déjà existante. Ce faisant, nous obtenons ainsi un Facteur Z' satisfaisant de  $Z' = 0.79$  nous permettant de valider le test pour réaliser le criblage (Figure 29.B). Le Facteur Z' est donc la première étape nécessaire pour

constater que la miniaturisation du test HMEC-MetLuc a été réalisée avec succès, pour obtenir des cellules viables en 96 puits et capables de produire une activité luciférase suffisante et détectable.



**Figure 29: Détermination de la force du modèle HMEC-MetLuc en calculant le Z' Factor.** (A.) : Calcul du Z' Factor en utilisant BMP9 1ng/mL comme contrôle positif du criblage, rapportée en activité Metridia Luciférase en unités relatives de luminescence (RLU) par réplicat. (B.) : Calcul du Z' Factor en utilisant le Sérum de Veau Fœtal (SVF 10%) comme contrôle positif du criblage, rapportée en activité Metridia Luciférase en unités relatives de luminescence (RLU) par réplicat.

### 1.3.5 Protocole de criblage pour HMEC-MetLuc

La mise au point du système pour la miniaturisation et la robotisation fut un travail long et difficile. Il a fallu dans un premier temps évaluer la robustesse, la viabilité et la capacité de réponse pour un criblage à grande échelle. Grâce à un dispenseur automatique à 8 pointes (multidrop), nous avons pu ensemer ces cellules d'une manière plus homogène et automatique dans des plaques 96 puits Greiner White Flat Bottom préalablement enduites de gélatine. Les cellules reposent dans les plaques à température ambiante pendant 30 minutes afin de sédimenter, et éviter les mouvements de convection potentiels induits par l'incubateur, poussant les cellules sur les bords des puits. Puis, elles sont placées à l'incubateur à 37°C CO<sub>2</sub> 5% pour la nuit. Toutes ces étapes permettent de réduire l'effet de plaque qui peut être appliqué sur le test (ex. : plus chaud au centre de la plaque que sur les bords, pouvant conduire à des viabilités différentes des cellules entre les puits).

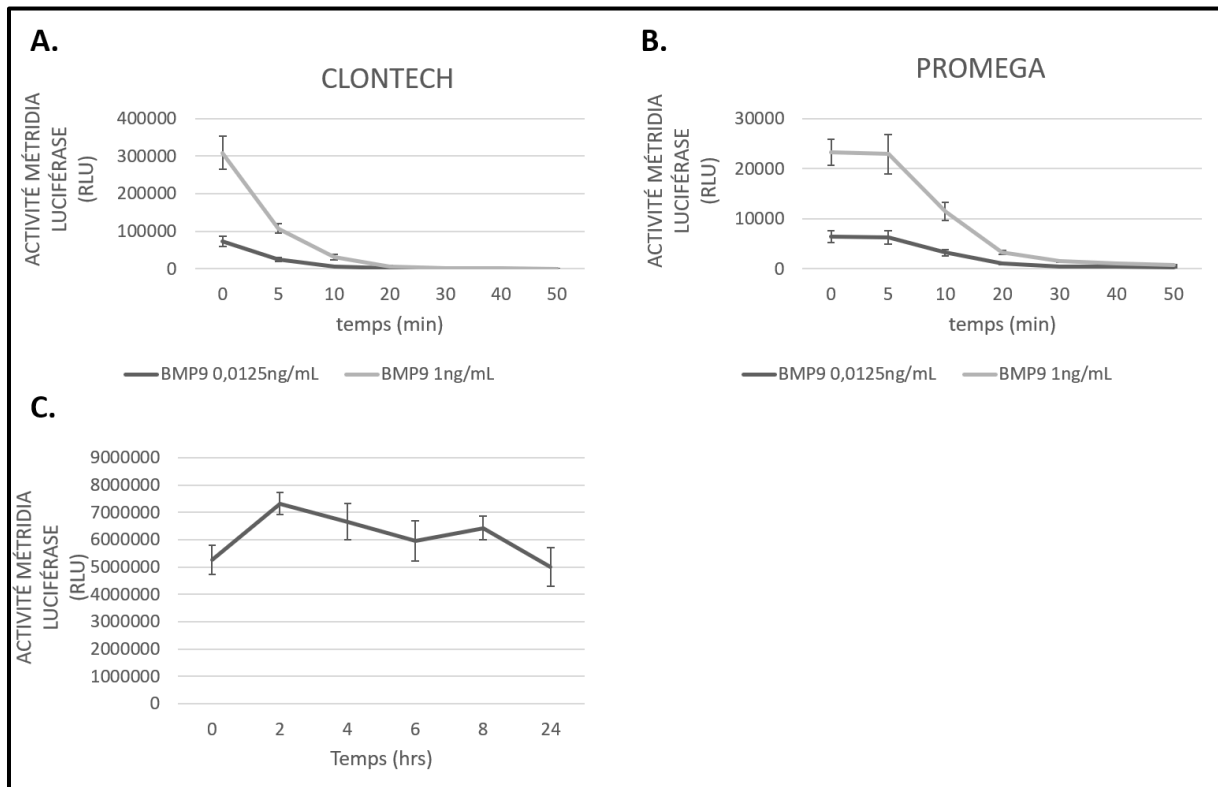
Par ailleurs, les cellules HMEC MetLuc sont très sensibles au détachement. Le laveur du robot a nécessité différentes mises au point pour régler la descente de la tête d'aspiration (pour aspirer les milieux sans toucher le tapis cellulaire) et également gérer une vitesse d'éjection douce des liquides de rinçage (DPBS -/-) pour ne pas décoller le tapis cellulaire. Même dans ces réglages, la gélatine était nécessaire pour maintenir les cellules en bon état. Ces étapes sont réalisées le deuxième jour du criblage. Le dépôt des milieux de déprivation (sans SVF) était également réglé sur une vitesse d'éjection la plus basse possible, opérée par une tête 8 pointes dispensant colonne par colonne. Les cellules sont placées dans l'incubateur de la plateforme pendant 6h. Le robot est capable de diluer les molécules dans le BMP9 12.5pg/mL avec une tête 96 pointes, ce qui rend cette étape très rapide. Cependant comme le BMP9 adhère facilement aux parois en plastique, il nous a fallu essayer différents réservoirs pour trouver celui qui se comporte le plus comme un tube « low protein binding », que nous utilisons au laboratoire pour stocker ou diluer le BMP9. Ainsi, une tête 96 pointes ajoute les molécules diluées, puis la tête 8 pointes ajoute les contrôles. Les cellules sont alors replacées à l'incubateur pour la nuit.

Au jour 3 du criblage, les surnageants sont prélevés puis déposés dans une plaque de lecture blanche et peuvent être lus sur la plateforme aussitôt ou congelés à -80°C pour lecture ultérieure.

### 1.3.6 Choix du substrat et stabilité des composés

J'ai également mené des études de stabilité des différents éléments de lecture. J'ai étudié la stabilité de la *Metridia* Luciférase à -80°C et à température ambiante. J'ai constaté que l'activité de l'échantillon était stable pendant 24h. Par ailleurs, j'ai aussi analysé la stabilité de la réaction avec le substrat proposé par Clontech. En prélevant du surnageant de cellules stimulées par du BMP9, j'ai injecté à t=0 le substrat dans les surnageants puis j'ai effectué une lecture sur un luminomètre à tube Berthold à différents temps. On constate une diminution rapide de la luminescence, jusqu'à atteindre des valeurs basses et peu détectables à 10 minutes, puis nulles à 20 minutes (Figure 30.A). Le substrat de Clontech fonctionnant sur le même principe que le Stop'n'Glo de Promega, je l'ai donc comparé selon le même protocole. Ce dernier est plus stable sur 5 minutes, puis commence à diminuer. Cela donne une fenêtre de stabilité de réaction plus intéressante (Figure 30.B). Ainsi cela nous oriente quant au procédé de lecture appliqué sur le lecteur TECAN Infinite M1000 de la plateforme de criblage.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le rouge de phénol présent dans le DMEM n'influe pas sur la lecture. De plus, ces substrats sont sensibles à l'oxydation, nécessitant une injection douce dans les puits. Nous avons également paramétré les temps d'acquisition de luminescence pour un résultat optimal (soit un compte total de photons sur 10 secondes). Enfin, nous avons opté pour un mode de lecture puit à puit, avec injection et lecture instantanée d'un puit afin d'avoir les meilleures Unités Relatives de Luminescence (RLU) possibles. Une lecture complète de plaque met donc 25 minutes, soit environ 7h de lecture à programmer pour 16 plaques. Ces mises au point ont duré approximativement de Mars à Juin 2017, avec le criblage qui a été lancé fin Juin à début Juillet 2017. Pour un criblage de 3072 points, il faut 2 semaines complètes pour obtenir le résultat final.



**Figure 30 : Caractérisation des stabilités des substrats de la luciférase et de son activité enzymatique.** (A.) : Stabilité du signal de la Metridia Luciférase issue de HMEC-MetLuc stimulées au BMP9 12.5pg/mL ou 1ng/mL, avec le substrat Renilla fourni par Clontech. Le substrat est ajouté au temps zéro, puis on effectue une lecture d'un même échantillon à différents temps (en triplicat, n=1). (B.) : Stabilité du signal de la Metridia Luciférase issue de HMEC-MetLuc stimulées au BMP9 12.5pg/mL ou 1ng/mL, avec le substrat Renilla fourni par Promega. Le substrat est ajouté au temps zéro, puis on effectue une lecture d'un même échantillon à différents temps (en triplicat, n=1). (C.) : Stabilité de la Metridia Luciférase. Des surnageants ont été prélevés de HMEC-MetLuc cultivées avec du Sérum de Veau Fœtal (SVF 10%) et stockés à température ambiante. Les Luciférases sont ainsi testées à différents temps (en triplicat, n=1).

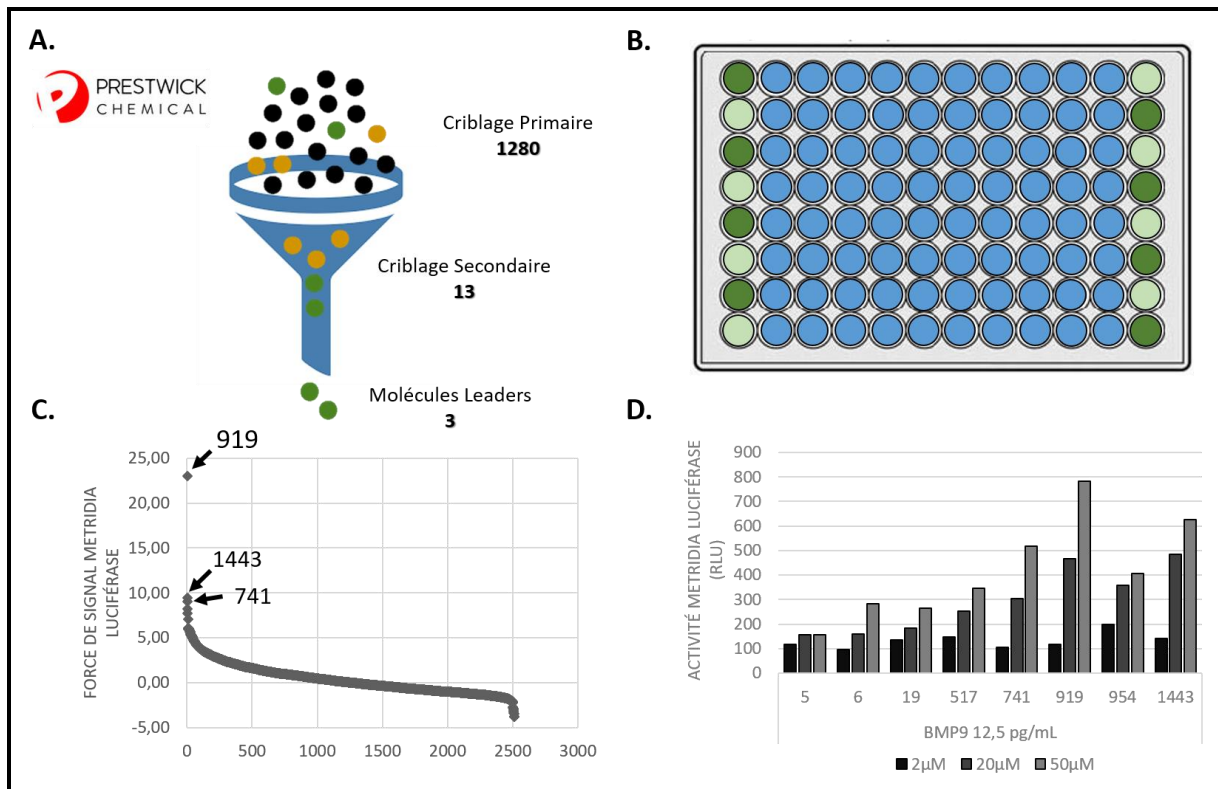
### 1.3.6 Choix de la chimiothèque Prestwick

J'ai effectué un criblage primaire sur la chimiothèque Prestwick, contenant 1280 molécules validées par la FDA et l'EMA. Cette chimiothèque est intéressante puisqu'il s'agit de médicaments existants sur le marché et donc accessible pour les patients souffrants de maladies rares, évitant les mises au point évoquées précédemment et donc accélérant le processus de traitement. Nous avons criblé ces molécules candidates à 2 et 20 $\mu$ M en simplicité et en présence de BMP9 12.5pg/mL. On considèrera comme hit positif du crible toute molécule induisant au minimum 2 fois la réponse BMP9 12.5pg/mL. Ceci nous fait alors cribler un total de 2560 conditions. Nous pouvons mettre par plaque 96 puits 80 points pour les molécules, les 16 autres étant occupées par les contrôles positifs et négatifs (Figure 30.B), ce qui fait un total de 32 plaques, soit 3072 puits.

## 2. Criblage de la chimiothèque Prestwick

### 2.1 Présentation du Criblage

Des 1280 molécules testées, 13 sont sorties positives du criblage primaire de la banque Prestwick. J'ai affiné leur caractérisation lors du crible secondaire, en les testant en triplicat à 2, 20 et 50µM et en présence de BMP9 12.5pg/mL. 3 candidats ressortent satisfaisants du test, à savoir les molécules 741, 919 et 1443 (Figure 31). Cependant lors d'essais complémentaires faits manuellement et non sur la plateforme robotisée, seule la molécule 919 a donné des résultats similaires au crible et a été validée pour poursuivre son investigation.



**Figure 31 : Résultats du criblage de la chimiothèque Prestwick sur le modèle HMEC-MetLuc.** (A.) : Schéma récapitulatif du Criblage sur la chimiothèque Prestwick. (B.) : Plaquette 96 puits type représentant une plaquette de criblage. Les puits verts foncés ● représentent les contrôles positifs, les puits verts clairs ○ représentent les contrôles négatifs, et les puits bleus ● les points tests. (C.) : Résultats du criblage primaire, les molécules sont classées selon la force du signal produit par la Metridia Luciférase, valeur calculée par le logiciel d'analyse de criblage développé par la plateforme CMBA. (D.) : Résultats du criblage secondaire. Les candidats ont été criblés en triplicat à trois doses (2, 20 et 50µM) en présence de BMP9 12.5pg/mL. Ici sont représentés les hits ayant eu une activité Metridia Luciférase positive lors du crible secondaire, parmi lesquels seuls les 741, 919 et 1443 ont été étudiées par la suite (en simplicat, n=1).

Le meilleur candidat identifié est donc la molécule 919 : la Bacitracine. Il s'agit d'un antibiotique produit par *Bacillus subtilis*, agissant sur la paroi bactérienne en inhibant la déphosphorylation du pyrophosphate d'isoprényle C<sub>55</sub>.

## 2.2 Résultats du criblage de Prestwick : Bacitracine

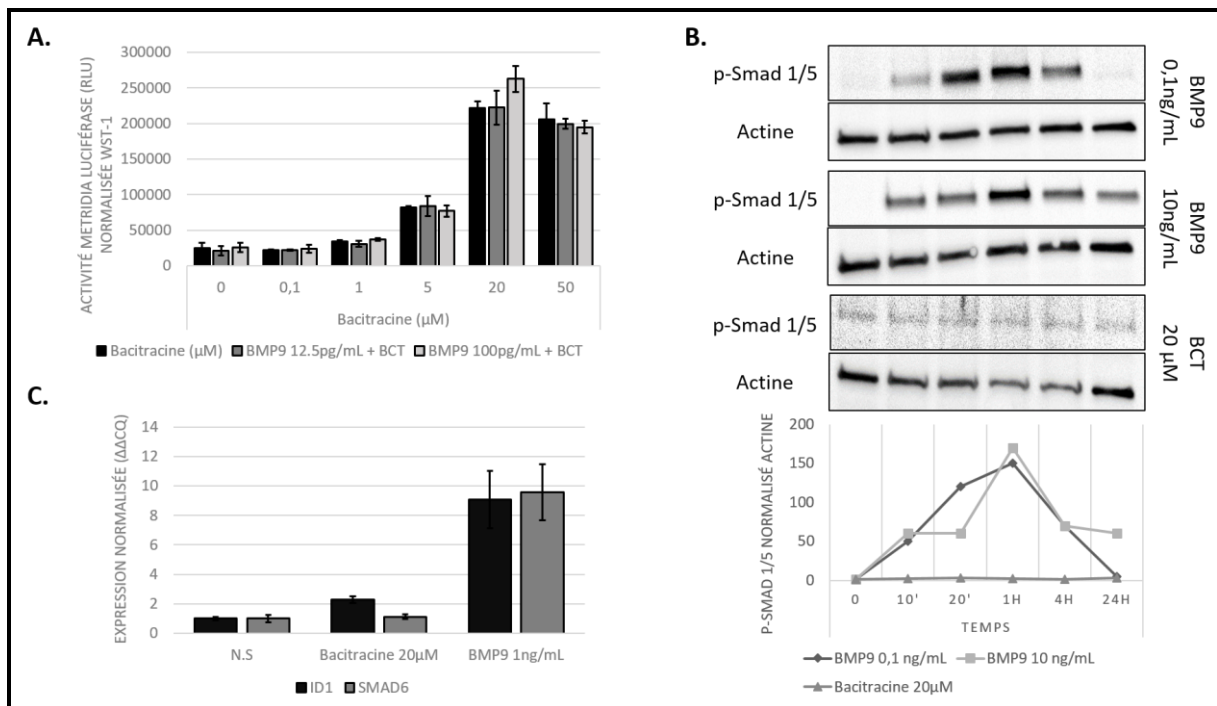
J'ai donc essayé de comprendre comment cette molécule pouvait activer la voie BMP9. Dans un premier temps, j'ai évalué l'effet de la bacitracine sur la réponse BRE-luciférase. En effectuant une analyse de dose réponse avec de la bacitracine seule ou en présence de BMP9 12.5pg/mL ou 100pg/mL, nous nous sommes aperçus que l'effet observé de la bacitracine sur la *Metridia* luciférase était le même dans les trois conditions, seule ou avec les deux doses de BMP9 (Figure 32.A). Nous avons constaté que l'effet de cette molécule semblait plus important que celui induit par BMP9. La bacitracine induit une activité *Metridia* Luciférase plus élevée que BMP9 et ne potentialise pas l'effet de BMP9.

J'ai ensuite effectué des cinétiques de stimulations par bacitracine et BMP9 pour voir si la bacitracine activait la phosphorylation des Smads 1/5, de manière précoce ou tardive (Figure 32.B). Dans un premier temps, les HMEC-MetLuc ont été stimulées par de la bacitracine 20µM ou BMP9 0.1ng/mL ou 10ng/mL à différents temps (10min, 20min, 1h, 4h et 24h). Les surnageants sont prélevés aux temps indiqués, puis l'activité luciférase sera analysée ultérieurement (Figure 33.B). Une fois les surnageants retirés, les cellules ont été lysées pour étudier l'état de phosphorylation intracellulaire des Smads 1/5. On constate qu'une faible dose de BMP9 (0.1ng/mL) induit une phosphorylation précoce, avec un pic entre 20min et 1h, puis redescend jusqu'à un niveau nul de p-Smad 1/5 à 24h. Une forte dose de BMP9 (10ng/mL) induit également une phosphorylation précoce à 10min, un pic à 1h puis redescend et se maintient jusqu'à 24h. De manière surprenante, la bacitracine n'induit aucunement la phosphorylation des Smads 1/5. Il semblerait alors que cette molécule serait capable d'induire une activité luciférase BRE sans passer par la voie canonique de BMP9.

J'ai ensuite investigué si la bacitracine avait un effet sur les gènes cibles de la voie BMP9 (notamment ID1 et Smad6) par RT-qPCR, sur des HMEC-MetLuc stimulées par BMP9 ou Bacitracine. Lorsque que l'on regarde les niveaux d'expression en ARNm des gènes cibles de la voie BMP9, on constate que BMP9 induit fortement les niveaux d'ARNm d'ID1 et Smad6 en 24hrs. Cependant, la bacitracine n'induit pas l'expression de ceux-ci, notamment ID1 dont une



séquence du promoteur artificiel est répétée deux fois dans le promoteur de la *Metridia* Luciférase. On se heurte alors à une réponse contradictoire du système cellulaire (Figure 32.C).



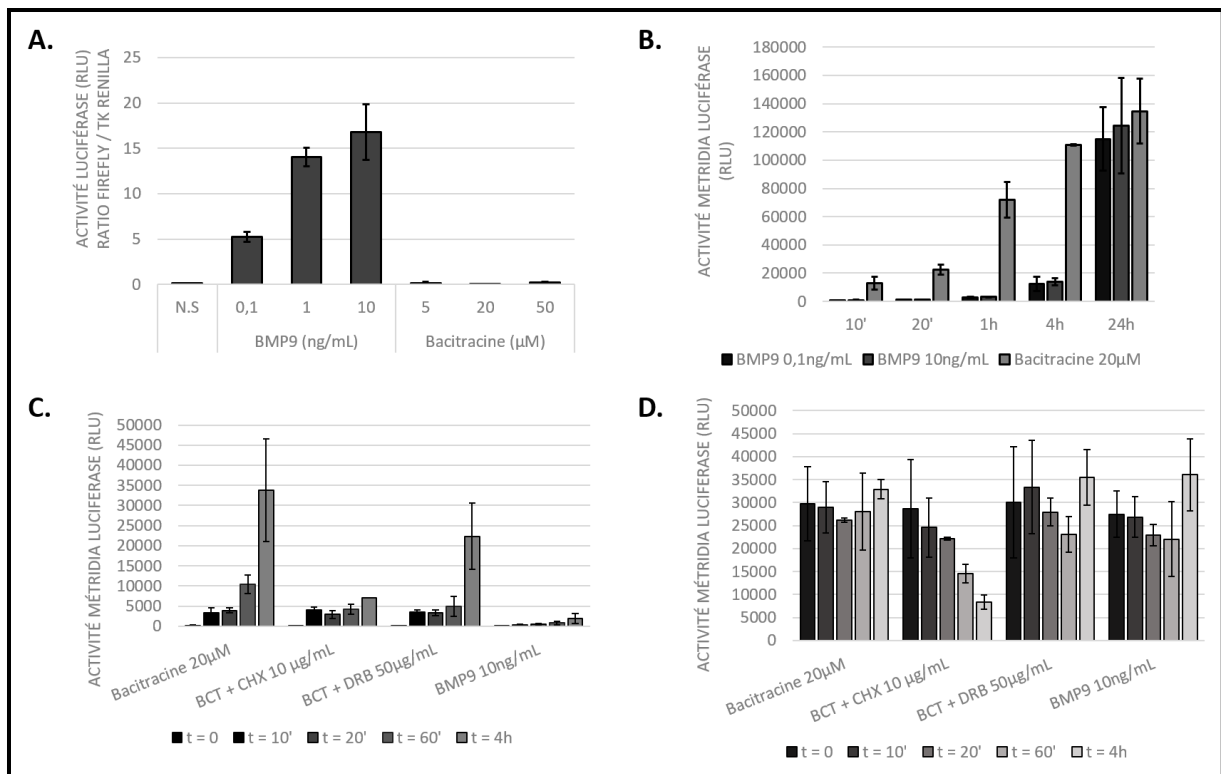
**Figure 32 : Caractérisation de la Bacitracine.** (A.) : Activité *Metridia* Luciférase d'une dose réponse de Bacitracine, seule ou en présence de BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) normalisée au WST-1 (en triplicat, n=1). (B.) : Activité *Metridia* Luciférase en cinétique de Bacitracine 20μM (BCT) comparée à deux doses de BMP9. Une fois les surnageants récupérés, les cellules sont lysées pour analyser l'état de phosphorylation des Smads 1/5 (en dessous). Les pistes correspondent aux temps indiqués sur le graphique quantitatif au-dessus (en simplicité, n=1). (C.) : Expression d'ID1 et Smad6 normalisé HPRT sur des HMEC-MetLuc stimulées par BMP9 ou bacitracine pendant 24hrs (en duplicat, n=1).

Ces résultats laissent supposer que la bacitracine induit l'expression de la *Metridia* Luciférase, de manière indépendante de la voie BMP9/ALK1/Smad1-5. Ce qui pose donc problème puisque l'on n'affecte en aucun cas la voie d'intérêt. J'ai donc mené des tests complémentaires afin de confirmer si la bacitracine était un faux positif du criblage.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le système de transfection transitoire utilisé en routine au laboratoire sur des 3T3 (fibroblastes) pour quantifier l'activité BMP9, comprenant deux plasmides dérivés de pGL3 BRE Firefly Luc et TK Renilla Luc de Promega, que j'ai adapté sur des HMEC-1 (Figure 33.A). Les cellules sont transfectées 4h, puis on ajoute du BMP9 et/ou Bacitracine pendant une nuit. On constate que le BMP9 augmente bien de façon dose-dépendante l'activité luciférase, alors que la bacitracine échoue à reproduire la stimulation observée dans le modèle HMEC-MetLuc. Ce qui confirme l'absence de

phosphorylation des Smads 1/5 et l'expression nulle des gènes cibles codant ID1 et Smad6. La bacitracine n'agit pas sur la voie BMP9 et n'active pas ce système rapporteur luciférase laissant supposer un effet faux positif sur le système HMEC-MetLuc. Ceci est appuyé par les cinétiques effectués préalablement en Western Blot (Figure 32.B), dont j'ai récupéré les surnageants pour évaluer l'activité luciférase (Figure 33.B). On constate que la Bacitracine induit une activité luciférase très précoce dès 10 min pour atteindre un plateau après 4h. Cependant, le BMP9 à forte et faible dose commence à induire une activité luciférase au bout de 4h et atteint les mêmes niveaux que la bacitracine au bout de 24h. Il semble alors improbable que la bacitracine soit capable de synthétiser une *Metridia* Luciférase fonctionnelle et secrétée en à peine 10min.

Pour comprendre ces résultats, j'ai effectué des cinétiques courtes de stimulations (10min à 4h) en utilisant des inhibiteurs de traduction (Cycloheximide – CHX) et de transcription (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole – DRB) pré-incubés pendant 1h, puis la bacitracine est ajoutée. L'activité de la *Metridia* Luciférase a été mesurée à la fois dans les surnageants et les lysats cellulaires (Figure 33.C et 33.D).



**Figure 33 : Effet d'inhibiteurs de transcription et traduction sur l'effet de la Bacitracine.** (A.) : Activité Luciférase Firefly normalisée TK Renilla de cellules HMEC-1 transfectées pGL3 BRE Luc et TK Renilla, stimulées par BMP9 ou Bacitracine, en Unités Relatives de Luminescence (RLU) (en triplicat, n=1). (B.) : Activité Métridia Luciférase de HMEC-MetLuc stimulées par BMP9 ou Bacitracine à différents temps, en Unités Relatives de Luminescence (RLU) (en triplicat, n=1). (C.) : Activité Métridia Luciférase en cinétique mesurée dans les surnageants de HMEC-MetLuc stimulées par de la Bacitracine (BCT), BCT + CHX, BCT + DRB et BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) (en triplicat, n=1). (D.) : Activité Métridia Luciférase en cinétique mesurée dans les lysats cellulaires de HMEC-MetLuc stimulées par de la Bacitracine (BCT), BCT + CHX, BCT + DRB et BMP9, en Unités Relatives de Luminescence (RLU) (en triplicat, n=1).

On constate que l'induction de l'activité luciférase dans les surnageants par la bacitracine n'est pas inhibée par la présence d'un inhibiteur de transcription suggérant un rôle post-transcriptionnel de la bacitracine (Figure 33.C). L'addition de CHX, ne diminue pas non plus l'activité luciférase pendant les premières 20 min ce qui suggère que cette sécrétion précoce est indépendante d'une synthèse protéique. Ce résultat suggère que l'augmentation précoce de la luciférase par la bacitracine soit due à un effet de la bacitracine sur la sécrétion de la luciférase. Aux temps plus longs la CHX diminue l'activité luciférase dans les surnageants mais aussi dans les lysats cellulaires et correspond donc à la durée de vie de la luciférase. L'expression de la luciférase intracellulaire n'est pas augmentée par la présence de la bacitracine confirmant que la bacitracine n'induit pas l'expression de la luciférase. La bacitracine est donc probablement un faux positif agissant sur la sécrétion de la luciférase et

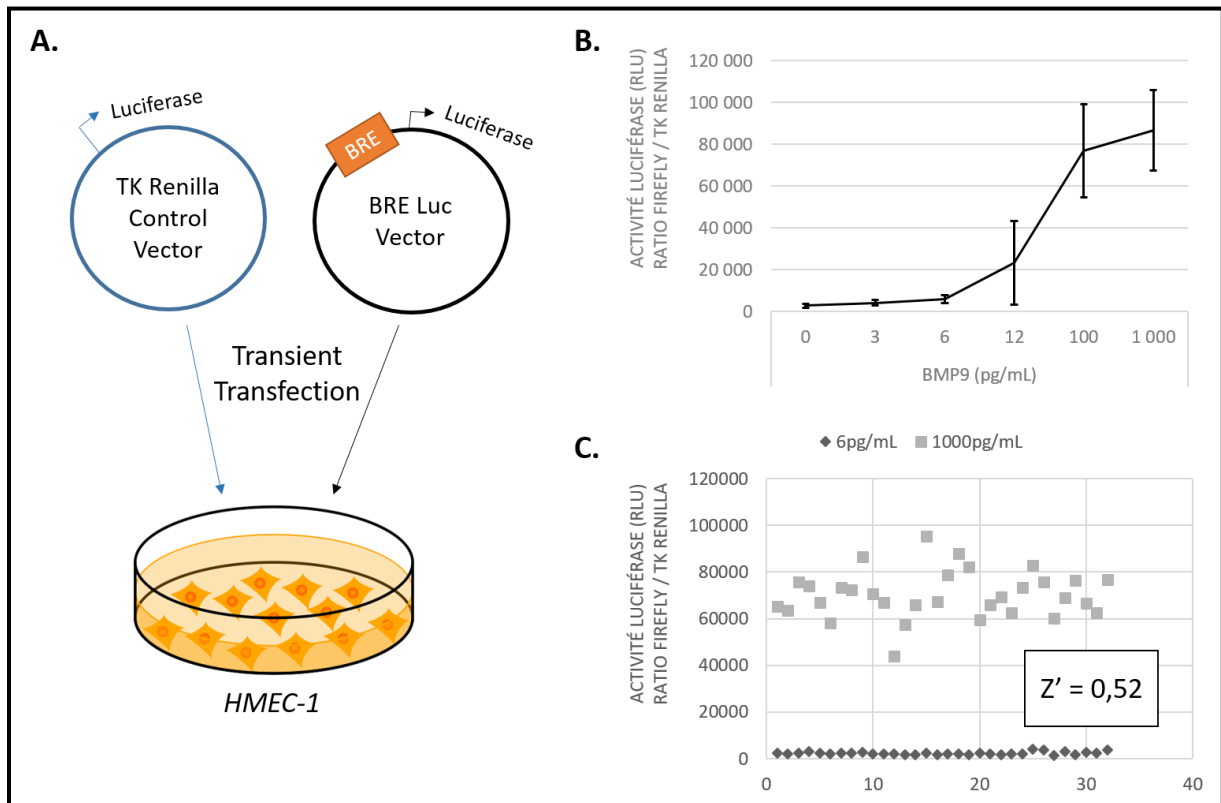
peut-être des protéines en général. L'outil *Metridia* Luciférase qui nous permettait de mesurer l'activité luciférase directement dans les surnageants s'est avéré en fait un générateur de faux positif permettant d'identifier des régulateurs de sécrétion de protéines.

Néanmoins, ce premier criblage nous a permis de conclure quant à la qualité du système développé et aux limites qu'il pouvait proposer, à savoir une sensibilité amoindrie et des effets sur la sécrétion à contrôler. Les hits obtenus lors de criblage étaient en fait des faux positifs, nous faisant conclure que ce système n'était pas adéquat pour un criblage à haut débit, à moins de caractérisations assez lourdes lors du crible secondaire en utilisant des inhibiteurs de traduction et sécrétion afin d'affiner les recherches de candidats potentialisateurs. Nous pourrions cependant proposer un nouveau rôle de la bacitracine, qui semble stimuler les phénomènes sécrétoires de la cellule.

### 3. Développement d'un deuxième test de criblage : HMEC-1 FR Luc

Suite aux résultats faux-positifs du premier criblage, nous avons choisi de changer de méthode de criblage en adaptant un test cellulaire que nous utilisons en routine au laboratoire qui consiste à co-transfecter deux plasmides : un pGL3 BRELuc codant pour une luciférase de luciole (Firefly) en aval d'un promoteur BMP Response Element (Korchynskyi) rapportant la réponse BMP9, puis d'un plasmide TK Renilla de Promega codant une luciférase Renilla en aval d'un promoteur TK, permettant de normaliser le signal. Le test étant utilisé au laboratoire sur des fibroblastes 3T3 en 24 puits, j'ai dû adapter et miniaturiser le test pour des HMEC-1 en 96 puits pour qu'il soit utilisable pour un criblage à haut débit. En effet, la lignée cellulaire 3T3 est une lignée idéale pour ces essais car ces cellules tolèrent très bien la transfection, et par ailleurs poussent très vite. Cependant il faut leur ajouter un plasmide d'expression d'ALK1 en plus des plasmides rapporteurs, car elles n'expriment pas ALK1 à leur surface, n'étant pas des cellules endothéliales. Les HMEC-1 exprimant ALK1, nous pouvons nous passer de la surexpression de ce récepteur. J'ai donc ajusté la culture cellulaire pour les HMEC-1 en 96

puits, puis j'ai diminué la quantité de Lipofectamine 2000 et pGL3 BRE Luc / TK Renilla à transférer.



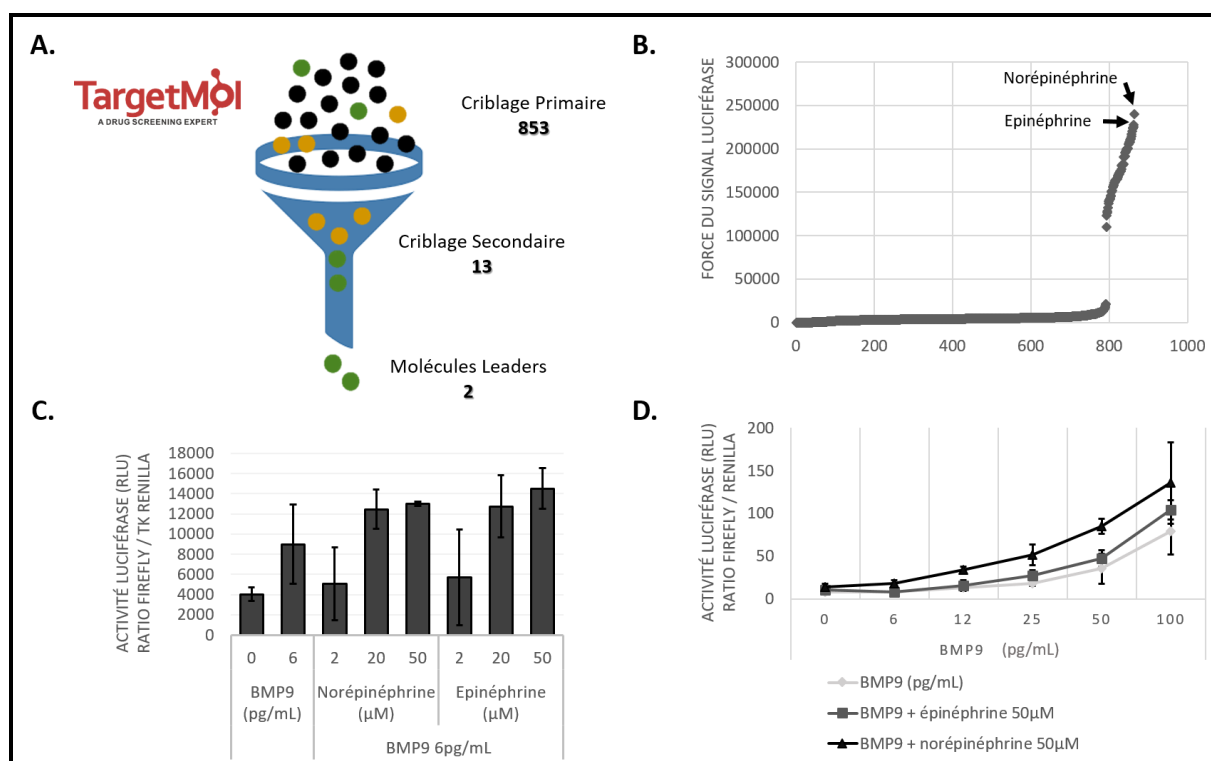
**Figure 34 : Mise au point du modèle HMEC FR Luc pour un criblage en 96 puits.** (A.) : Représentation schématique de la technique utilisée pour le criblage. Des HMEC-1 sont transfectées transitoirement par deux plasmides : pGL3 BRE Luc rapportant la voie BMP9, et TK Renilla permettant de normaliser le signal et la quantité de matériel de transfection dans les puits. (B.) : Activité Luciférase d'une dose réponse de BMP9 dans le modèle HMEC FR Luc, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla (en triplicat, n=1). (C.) : Calcul du Z' Factor sur ce modèle, en prenant BMP9 6pg/mL en contrôle négatif et BMP9 1ng/mL en contrôle positif, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla par réplicat.

La mise au point robotique fût également longue et difficile, puisque j'ai dû évaluer la stabilité du mix de transfection. En effet, la lipofectamine est également adhérente sur les parois et nécessite des bacs low protein binding ainsi que des pointes en graphite pour limiter l'adhésion de celle-ci sur les parois et obtenir une transfection homogène. La limite de la reproductibilité de ce système est donc d'avoir une quantité de plasmides transfectés égale dans tous les puits. Pour ce faire, j'ai essayé trois méthodes :

- Transfecter pendant 6h des HMEC-1 en boîte de Pétri, puis ensemencement d'un pool cellulaire transfecté en 96 puits.
  - **MAIS** Les cellules ne tolèrent pas la trypsine après la lipofectamine, et meurent. De plus, l'ensemencement en SVF1% (contenant du BMP9) induit le BRE qui augmente le bruit de fond.
- Mettre un mix de transfection en fond de puits d'une plaque 96 puits, et ajouter les cellules dans ces puits
  - **MAIS** Les cellules fraîchement passées à la trypsine ne tolèrent pas le mix de transfection lors de la sédimentation, et meurent.
- Ensemencer les cellules en 96 puits et laisser poser une nuit, puis transfecter le lendemain, selon le protocole usuel.
  - Les cellules sont viables et fonctionnelles.

Ainsi la troisième méthode nous a permis d'initier le criblage. Cependant, cette méthode nécessite de transfecter les cellules dans les puits ce qui entraîne un facteur d'hétérogénéité, et nécessite de réaliser des triplicats pour des résultats significatifs.

Ce système présente une sensibilité plus importante avec un  $EC_{50}$  d'environ 50pg/mL en accord avec les données publiées précédemment par l'équipe (Figure 33.B) (Induction de 14 fois entre 6 et 100pg/mL pour HMEC FR Luc contre une induction de 2 fois pour les mêmes doses sur HMEC-MetLuc). Cette sensibilité nous permet d'utiliser BMP9 1 ng/mL comme contrôle positif d'induction. En effet nous avons obtenu un Z' Factor satisfaisant de 0.52 (Figure 34.C) en présence de BMP9 6pg/mL pour le contrôle négatif et 1000pg/mL pour le contrôle positif. Lors du criblage précédent, en utilisant la lignée HMEC-MetLuc, nous avons été obligés d'utiliser le SVF comme contrôle positif et donc d'activer d'autres récepteurs que le récepteur ALK1.



**Figure 35 : Résultats du Criblage de la chimiothèque TargetMol de Tebu-Bio sur le modèle HMEC pGL3 BRE Luc.**  
 (A.) : Résultats du criblage primaire, les molécules sont classées selon la force du signal produit par la Luciférase, valeur calculée par le logiciel d'analyse de criblage développé par la plateforme CMBA. (B.) : Activité Luciférase en réponse à l'épinéphrine et norépinéphrine, issus du criblage secondaire à trois doses et en présence de BMP9 6pg/mL, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla. (C.) : Activité Luciférase de l'épinéphrine et norépinéphrine à 50μM avec une dose réponse de BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla (en triplicat). (D.) : Schéma récapitulatif du criblage de la chimiothèque TargetMol (en triplicat, n=1).

### 3.1 Choix de la chimiothèque : TargetMol

Ayant déjà criblé la banque Prestwick avec le modèle HMEC-MetLuc et n'ayant pas obtenu de cibles intéressantes bien que n'étant pas dans un test de criblage optimal, nous avons choisi de cribler une autre banque qui propose également des molécules FDA approuvées à savoir TargetMol proposée par Tebu-Bio. Celle-ci comprend 1813 molécules, dont 47% sont également comprise dans la banque Prestwick. Nous avons choisi d'exclure les molécules déjà présentes dans la banque Prestwick. Nous avons donc réalisé ce second criblage avec 853 molécules. Ces molécules ont été testées comme précédemment à deux concentrations (2 et 20μM) en simplicat. Ceci nous fait donc 1706 conditions, soit 22 plaques d'essais avec 80 points molécules et 16 points contrôles, soit un total de 2058 puits à cribler. Au contraire du criblage précédent et par soucis de reproductibilité, les plaques ne sont pas lues dans la foulée. En effet, une lecture de plaque dure en moyenne 40 minutes, alors que

l'étape de stimulation (aspiration du milieu, rinçage et ajout des molécules) dure environ 12 minutes. Ainsi on aurait eu un décalage quant au temps de stimulation des dernières plaques. Nous avons alors décidé de congeler les lysats cellulaires pour une lecture ultérieure. La *Metridia* Luciférase est stable à -80°C et ne perd pas son activité après décongélation (tests que j'ai également fait durant la mise au point). Ainsi 12 plaques peuvent être lues par jour, donnant un total de deux jours complets de lecture pour 22 plaques.

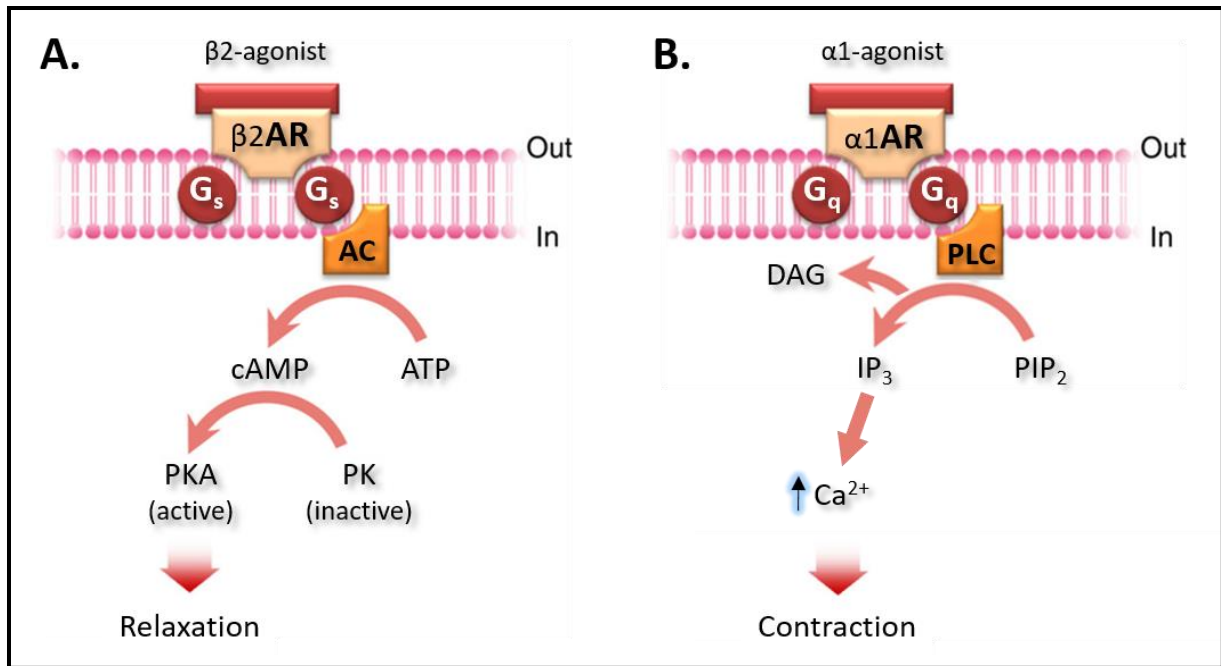
### 3.2 Protocole de criblage

J'ai tout d'abord criblé ces candidats en simplicat à 2 et 20  $\mu\text{M}$  en présence de BMP9 6pg/mL. Du criblage primaire nous avons sélectionné 13 molécules comme hits positifs en prenant comme critère une induction d'au moins 2 fois la réponse BMP9 6pg/mL (Figure 35.D). Nous avons ensuite passé ces 13 candidats avec les 14 candidats sortis positifs du 1<sup>er</sup> criblage primaire de Prestwick sur le modèle HMEC-MetLuc afin de confirmer ou infirmer la potentialité de ces molécules sur le modèle actuel. Ce qui nous a fait cribler au total 27 molécules pour le criblage secondaire ; à 2, 20 ou 50 $\mu\text{M}$  en triplicat et en présence de BMP9 6pg/mL. Aucune molécule de Prestwick n'est sortie positive à la suite de ce criblage secondaire, nous permettant de conclure quant à la faible efficacité du modèle HMEC-MetLuc établi et les faux positifs qu'il était susceptible de produire. Néanmoins, parmi les 13 molécules du criblage secondaire de TargetMol nous avons validé 2 candidats identifiés comme molécules leaders potentiels : Norépinéphrine et Epinephrine (Figure 35.B et 35.C). Ce résultat est encourageant, puisque les deux leaders font partie de la famille des agonistes  $\alpha/\beta$  adrénergiques. Sur un essai BRE Luc, on constate que la dose optimale pour ces molécules est de 50 $\mu\text{M}$ . La norépinéphrine semble cependant donner une réponse plus intéressante, puisque capable de doubler le signal induit par chaque concentration de BMP9, alors que l'épinéphrine donne une réponse moins importante, pour des concentrations en BMP9 à partir de 25pg/mL. De plus, il est à noter que la norépinéphrine et l'épinéphrine ne font pas effet en absence de BMP9, montrant que ce dernier est nécessaire à l'induction du signal. On semble donc avoir une réelle potentialisation d'une réponse BMP9 existante (Figure 35.D).



#### 4. Résultats du criblage de TargetMol : Epinéphrine et Norépinéphrine

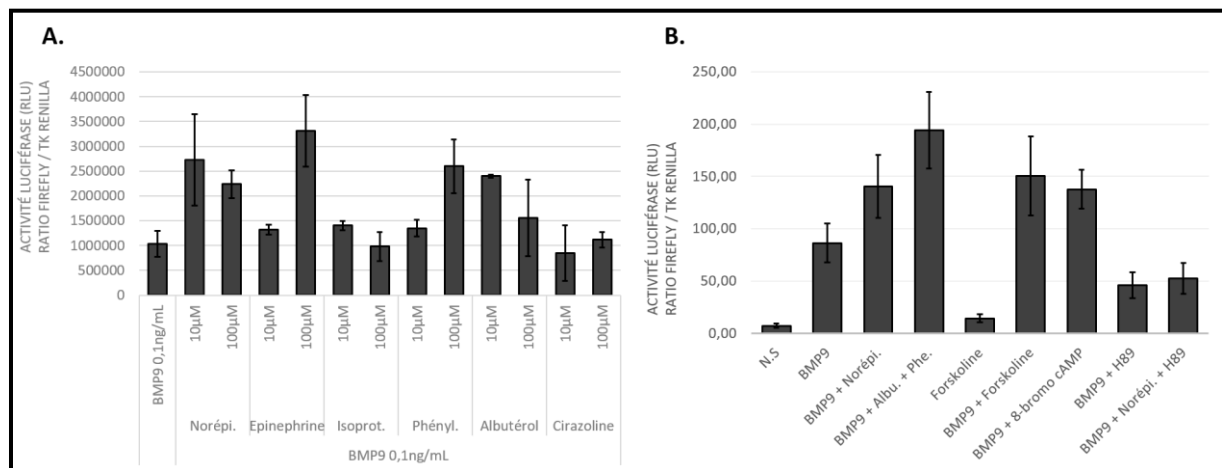
La norépinéphrine (noradrénaline) est le précurseur métabolique de l'épinéphrine (adrénaline), réaction catalysée dans le tronc cérébral par la PNMT (phényléthylamine-N-méthyltransférase), et sont tous deux des neurotransmetteurs de la famille des catécholamines. Ce sont des molécules agissant sur des récepteurs alpha et beta adrénergiques type GPCR (G Protein Coupled Receptor) permettant de moduler le tonus vasculaire. La norépinéphrine agit sur les récepteurs de type  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , couplés à des protéine Gq et une Phospholipase C, permettant de synthétiser de l'Inositol triphosphate qui libèrera le  $Ca^{2+}$  du Reticulum Sarcoplasmique induisant une contraction musculaire. Elle a donc un effet vasoconstricteur et permet le maintien de la pression sanguine (Figure 36). L'épinéphrine a une action à spectre plus large puisqu'agissant sur des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  mais aussi  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ . Sur les récepteurs de type  $\beta$ , les protéines Gs associées sont couplées à des Adenylates Cyclases permettant la synthèse d'AMPc pour l'activation de protéines kinases PKA et induire une relaxation musculaire. Elle permet ainsi d'induire une bronchodilatation et une vasodilatation. L'épinéphrine a donc des effets contraires selon les récepteurs exprimés sur les organes cibles. Les cellules endothéliales quant à elles expriment principalement des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta_2$  afin de réguler la pression sanguine, entre vasodilatation et vasoconstriction. Puisque la pharmacopée des  $\alpha/\beta$  adrénergiques est bien connue, nous avons choisi d'affiner la stimulation de ces voies en choisissant des agonistes pouvant soit se lier aux récepteurs  $\alpha_1$  (Phényléphrine et Cirazoline), soit se lier aux récepteurs  $\beta_2$  (Albutérol et Isoprotérénol).



**Figure 36 : Représentation schématique des voies de signalisations des récepteurs  $\alpha 1$  et  $\beta 2$  adrénergiques.** (A.) : La voie  $\beta 2$  met en jeu une protéine  $G_s$  liée à une Adénylate Cyclase (AC), métabolisant l'ATP en AMPc, permettant d'activer la Protéine Kinase A (PKA) et d'induire une dilatation des vaisseaux sanguins (adapté de Nardini S. et al., 2014, *Multidiscip Respir Med.*). (B.) : La voie  $\alpha 1$  met en jeu une protéine  $G_q$  liée à une PhosphoLipase C (PLC) métabolisant le phosphatidil inositol biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacyl glycérol (DAG) et en Inositol triphosphate ( $IP_3$ ), ce dernier ouvrant les canaux calciques du réticulum endoplasmique pour libérer le  $Ca^{2+}$  dans le compartiment intracellulaire et induire une constriction des vaisseaux sanguins (Adapté de Richard E. Klabunde, 2012, *Cardiovascular Physiology Concepts*).

J'ai tout d'abord essayé ces analogues sur notre modèle HMEC FR Luc, à 10 et 100 $\mu$ M en présence de BMP9 0.1ng/mL (Figure 37.A) afin de comprendre l'implication de ces deux voies signalétiques sur l'activité de la luciférase. Les molécules sont ici directement comparées à la condition BMP9 0.1 ng/mL. On confirme ici l'effet potentialisateur de la norépinéphrine aux deux doses, et un effet important de l'épinéphrine cette fois-ci à 100 $\mu$ M. Parmi les agonistes, on constate que seule la phényléphrine ( $\alpha 1$ ) à 100 $\mu$ M et l'albutérol ( $\beta 2$ ) à 10 $\mu$ M sont capables de potentialiser une réponse BRE en présence de BMP9, mais que la cirazoline ( $\alpha 1$ ) et l'isoprotérénol ( $\beta 2$ ) n'augmentent pas la réponse BRE. Il semblerait ainsi que les voies  $\alpha 1$  et  $\beta 2$  soient capables toutes deux de potentialiser une réponse BMP9. Au vu de la physiopathologie de l'HTAP notamment, il serait plus judicieux d'exclure la voie  $\alpha 1$  qui serait délétère pour les patients de par son effet vasoconstricteur. Nous avons donc choisi de caractériser d'avantage la voie  $\beta 2$  adrénergique (Figure 37.B). Pour tester la voie AMPc, j'ai utilisé de la Forskoline qui permet d'activer l'Adénylate Cyclase, du 8-bromo cAMP permettant d'activer la PKA et également du H89 qui inhibe cette même PKA. On constate que la

Forskoline n'affecte pas l'expression de la luciférase en absence de BMP9, mais la Forskoline et le 8-bromo AMPc potentialisent la réponse induite par BMP9. Ceci suggère que cette réponse est possiblement médiée par les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques, couplés à l'adenylate cyclase. De manière surprenante, en absence d'agoniste adrénergique, l'ajout de H89 diminue de moitié la réponse BMP9, suggérant qu'une partie de la réponse BMP9 sur l'activité BRE (médiée par la phosphorylation de Smad1/5) pourrait être AMPc-dépendante. Il nous faudra alors comprendre comment l'AMPc influe sur la voie BMP9.

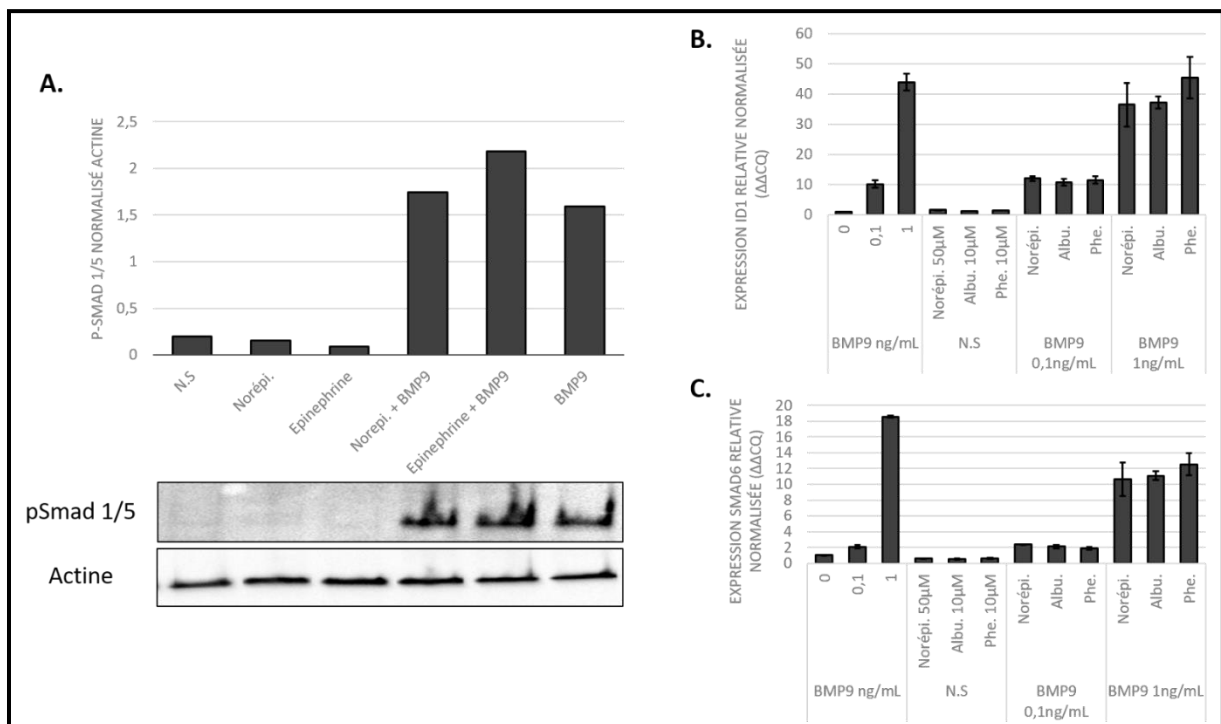


**Figure 37 : Effet des agonistes  $\alpha_1$  et  $\beta_2$  sur le BRE.** (A.) : Activité Luciférase en réponse à la Norépinéphrine et Epinéphrine, et agonistes  $\alpha_1$  (Phényléphrine et Cirazoline) et  $\beta_2$  (Isoprotérénol et Albutérol) en présence de BMP9 0.1ng/mL, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla (en triplicat, n=1). (B.) : Activité Luciférase en réponse à différents acteurs de la voie  $\beta_2$ , en présence ou non de BMP9 0.1ng/mL, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla. Norépinéphrine = 50µM ; Albutérol = 10µM, Phényléphrine = 50µM, Forskoline = 10µM, 8-bromo cAMP = 500µM, H89 = 10µM (en triplicat, n=1).

J'ai ensuite étudié les effets de ces agonistes  $\alpha_1$  et  $\beta_2$  sur la phosphorylation des Smads 1/5 au bout d'1h dans les HUVEC, comparé à l'effet induit par BMP9 (Figure 38.A). J'ai pu constater l'absence de phosphorylation des Smads 1/5 en présence de Norépinéphrine et Epinéphrine seules. Il est notable également que la phosphorylation induite par BMP9 n'est pas augmentée en présence de ces deux molécules. La norépinéphrine et l'épinéphrine ne semblent donc pas agir sur la phosphorylation des Smads 1/5. Suite à l'absence d'effets potentialisateurs, je n'ai pas testé l'albutérol ni la phényléphrine en Western Blot.

Ensuite, j'ai regardé l'effet de ces molécules sur l'expression génique d'ID1 et Smad6 (Figure 38.B et 38.C) dans des HUVEC stimulées par BMP9 ou les agonistes pendant 4h. J'ai choisi de caractériser uniquement la norépinéphrine avec les agonistes et non l'épinéphrine,

qui donnait des réponses moins sensibles sur le BRE. Les gènes ID1 et Smad6 sont connus comme fortement induits et de manière dose-dépendante par BMP9. Par contre ni la Norépinéphrine, ni l'abutérol ou la phényléphrine n'augmentent ou potentialisent l'expression d'ID1 induite par BMP9 à 0.1 ou 1ng/mL. Ces molécules n'induisent pas non plus l'expression de Smad6 et ne potentialisent pas la réponse avec la dose de BMP9 0,1 ng/mL voire même l'inhiberaient avec la dose de BMP9 à 1 ng/mL. En effet, cette Smad inhibitrice effectue un rétrocontrôle négatif sur les Smads 1/5, nous pourrions croire que l'on potentialise une réponse BMP9 en levant l'inhibition induite par Smad6. Comme cet effet est visible à 4h soit un temps court, on pourrait prolonger ainsi l'effet de la voie signalétique BMP9 qui permet de potentialiser l'activité luciférase par rapport à une condition BMP9 seule qui serait naturellement régulée.



**Figure 38 : Etude de l'effet des agonistes  $\alpha_1$  et  $\beta_2$  sur la voie BMP9.** (A.) : Western Blot p-Smad 1/5 sur des HUVEC stimulées par la Norépinéphrine (50µM) et Epinéphrine (50µM) seules ou avec BMP9 1ng/mL, avec quantification au-dessus du blot (en simplicité, n=1). (B.) : Expression relative d'ID1 normalisée RPL13a ( $\Delta\Delta Cq$ ) en réponse à la Norépinéphrine, Albutérol et Phényléphrine seuls ou avec BMP9, dans des HUVEC (en triplicat, n=1). (C.) : Expression relative de SMAD6 normalisée RPL13a ( $\Delta\Delta Cq$ ) en réponse à la Norépinéphrine, Albutérol et Phényléphrine seuls ou avec BMP9, dans des HUVEC (en triplicat, n=1).

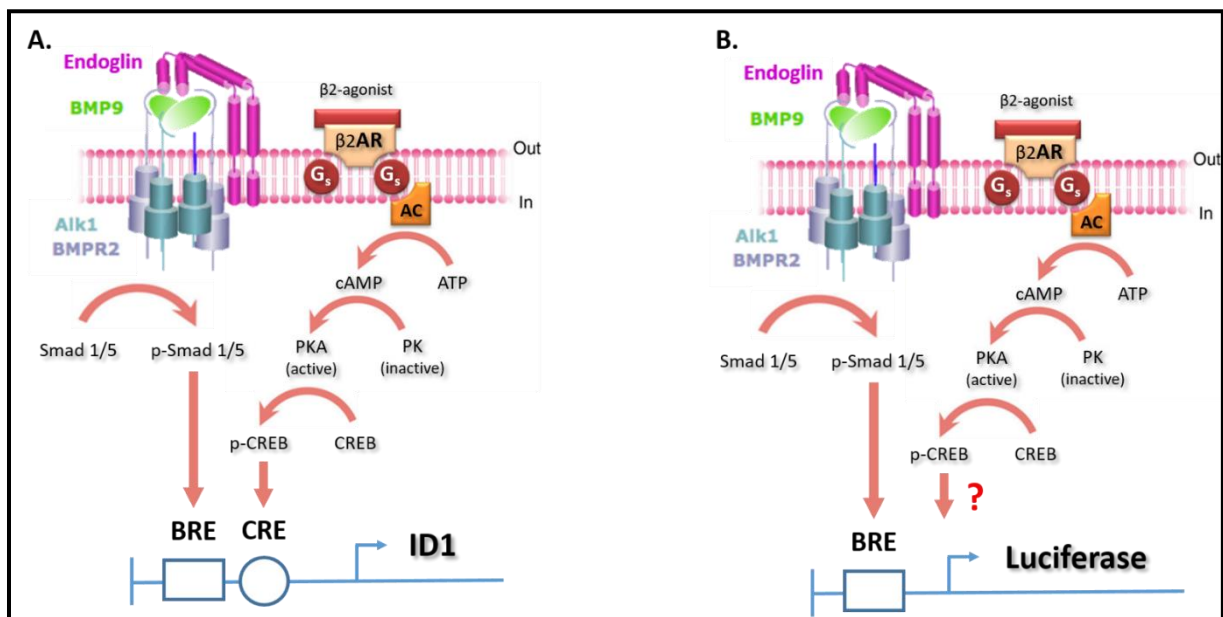
On constate alors un message contradictoire. En effet, l'absence de phosphorylation était attendue compte tenu de la voie de signalisation empruntée par ces agonistes alpha/beta adrénergiques. Néanmoins, la séquence BRE présente dans le plasmide pGL3 est une

séquence doublée provenant du promoteur d'ID1 ; on devrait alors s'attendre à une augmentation de l'expression du gène ID1 endogène. Ohta Y. *et al.* ont mené des études quant à l'effet de l'AMPc sur l'induction de l'expression endogène d'ID1 en réponse à BMP9 (Figure 38). En effet, le gène ID1 a dans son promoteur un BRE et un CREB Response Element (CRE). Ainsi, une réponse BMP9 activerait l'expression d'ID1, qui serait potentialisée avec l'activation du CRE. Par contre, l'activation seule du CRE ne suffit pas à activer l'expression d'ID1. Précisons ici qu'il s'agit du promoteur natif ID1, avec un BRE endogène alors que la séquence BRE-Luc développée par Korchinsky dans le plasmide pGL3 est dépourvue de CRE. Ils ont par ailleurs créé des constructions plasmidiques comprenant soit un BRE + CRE, BRE muté + CRE, BRE + CRE muté, et enfin BRE muté + CRE muté ; le tout en amont d'une luciférase. En concordance avec les résultats géniques, ils constatent :

- **BRE + CRE** : BMP9 active le BRE, en présence de CRE l'AMPc potentialise la réponse
- **BREm + CRE** : BMP9 n'active pas le BRE muté, le CRE natif avec AMPc ne potentialise pas et n'active pas la réponse
- **BRE + CREm** : BMP9 active le BRE, mais l'ajout d'AMPc ne potentialise pas la réponse dû au CRE muté
- **BREm + CREm** : Aucune réponse n'est observée.

On a ainsi des résultats concordants en terme de luciférase, cependant nous ne parvenons pas à obtenir une réponse équivalente au regard de l'expression génique d'ID1. Si on regarde la réponse BRE, on obtient l'effet publié par Ohta Y. *et al.* avec la potentialisation via l'AMPc. Or, j'ai investigué le plasmide pGL3 pensant qu'un CRE pourrait s'être formé lors de l'insertion du BRE dans le promoteur, ou encore dans la structure même du plasmide. Les résultats du séquençage n'ont montré aucun CRE dans le pGL3 BRE Luc et pGL3 Luc (sans BRE). De plus, j'ai essayé ces deux plasmides parallèlement avec norépinéphrine et BMP9, le plasmide pGL3 Luc sans BRE ne répond à aucune des deux molécules (comme observé dans les caractérisations précédentes pour le pGL3 BRE Luc). On se heurte ici à un paradoxe entre ce qui est publié et mes résultats, qui ne concordent pas du tout avec ce qui se passe entre la réponse BRE plasmidique et la réponse BRE ID1 endogène. J'ai également essayé d'étudier les expressions géniques d'ID1 et Smad6 dans différents modèles endothéliaux, et on retrouve les mêmes niveaux d'expression entre HMEC-1 et HUVEC. Cependant, les résultats de qPCR permettent de mettre en lumière la potentialisation observée sur le BRE. En effet, la voie  $\beta 2$

adrénergique par la production d'AMPc semble inhiber l'expression de Smad6, Smad inhibitrice effectuant un rétrocontrôle négatif sur les Smads 1/5 en entrant en compétition avec Smad4. En enlevant ce frein, on active alors davantage la synthèse de luciférase pour la même intensité signalétique en BMP9. Je parle ici d'avantage de la voie  $\beta_2$ , en effet les concentrations utilisées en norépinéphrine et phényléphrine étant fortes (50 $\mu$ M contre 10 $\mu$ M pour albutérol) on pourrait penser que ces molécules se lient préférentiellement aux récepteurs  $\beta_2$ . On pourrait tout de même proposer que la voie  $\beta_2$  adrénergique potentialise une réponse BMP9 en BRE Luc en levant l'inhibition induite par Smad6.



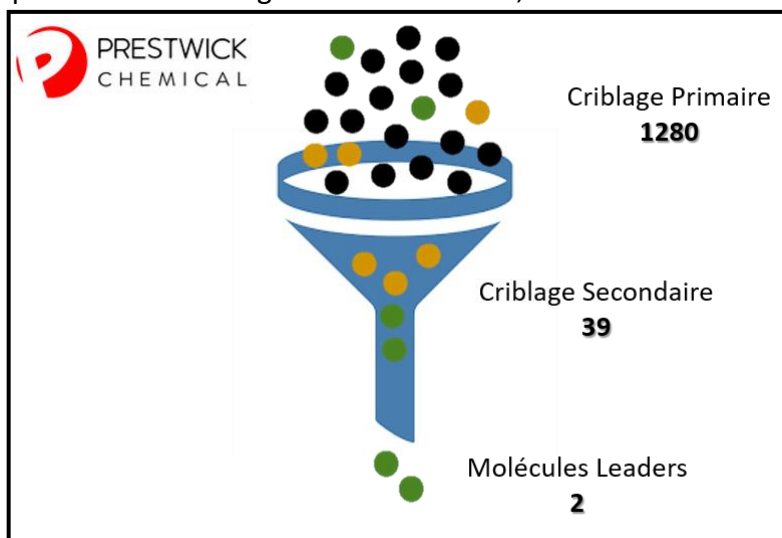
**Figure 39 : Représentation schématique du modèle proposé par Ohta Y. et al., 2008 J Bone Miner Metab.** (A.) : L'activation concomitante des voies BMP9 et  $\beta_2$  permettent une potentialisation de la réponse BMP9 endogène, résultant en une augmentation de l'expression d'ID1 et de l'activité luciférase par la présence d'un BMP Response Element (BRE) et un CREB Response Element (CRE) dans le modèle de Ohta Y. et al. (B.) : L'activation concomitante des voies BMP9 et  $\beta_2$  dans notre modèle permet une potentialisation de la réponse BMP9 endogène, résultant en une augmentation de l'activité luciférase par la présence d'un BRE, cependant notre construction ne présente pas de CRE. Par ailleurs, l'expression d'ID1 endogène n'est pas augmentée.

Ce deuxième criblage nous a permis de mettre en évidence une famille d'agonistes capables d'activer le gène rapporteur sous le promoteur ID1, mais nous n'avons pas pu valider cet effet activateur sur les deux gènes cibles de BMP9 étudiés. Ces résultats ne nous permettant pas complètement de valider cette famille de molécules, nous avons choisi de faire un nouveau criblage. Cependant, le cas de l'albutérol, ou salbutamol (ventoline) sera discuté ultérieurement, qui pourrait être tout de même un candidat de choix pour HHT et HTAP de par son mode d'administration et son effet  $\beta_2$  adrénergique.

## 5. Criblage de la chimiothèque de Prestwick sur le modèle HMEC FR Luc

### 5.1 Protocole de Criblage

Puisque le criblage de la chimiothèque TargetMol sur HMEC FR Luc donnait des contradictions entre luciférase et voie de signalisation BMP9, et celui de la chimiothèque Prestwick sur HMEC MetLuc présentait entre autres des faux positifs, nous avons donc choisi de cribler une nouvelle fois la chimiothèque Prestwick mais cette fois-ci avec le modèle HMEC FR Luc. Ce criblage a été plus long par rapport à celui de la chimiothèque TargetMol, puisque cette fois-ci il a fallu prévoir davantage de points. Ainsi nous avons eu besoin de 2 semaines complètes pour effectuer le criblage puis 3 jours entiers de lecture pour 32 plaques. J'ai donc criblé 1280 molécules en simplicat à 2 et 20 $\mu$ M en présence de BMP9 6pg/mL. En sortie du criblage primaire, 42 candidats sont sortis positifs induisant au minimum 2 fois le signal de BMP9 6pg/mL. Parmi ces molécules, 8 faisaient parties des agonistes  $\alpha/\beta$  adrénergiques, dont l'isoprotérénol, l'épinéphrine et également l'AMPc. Ceci est tout de même encourageant puisque nous obtenons à nouveau cette famille moléculaire à partir d'une chimiothèque différente, confirmant l'effet de cette famille moléculaire sur une réponse BRE BMP9 dépendante. Nous avons exclu ces molécules que nous avons déjà caractérisées, pour en passer 39 en criblage secondaire. Ainsi, nous avons testé ces 39 candidats en triplicat à 2, 20

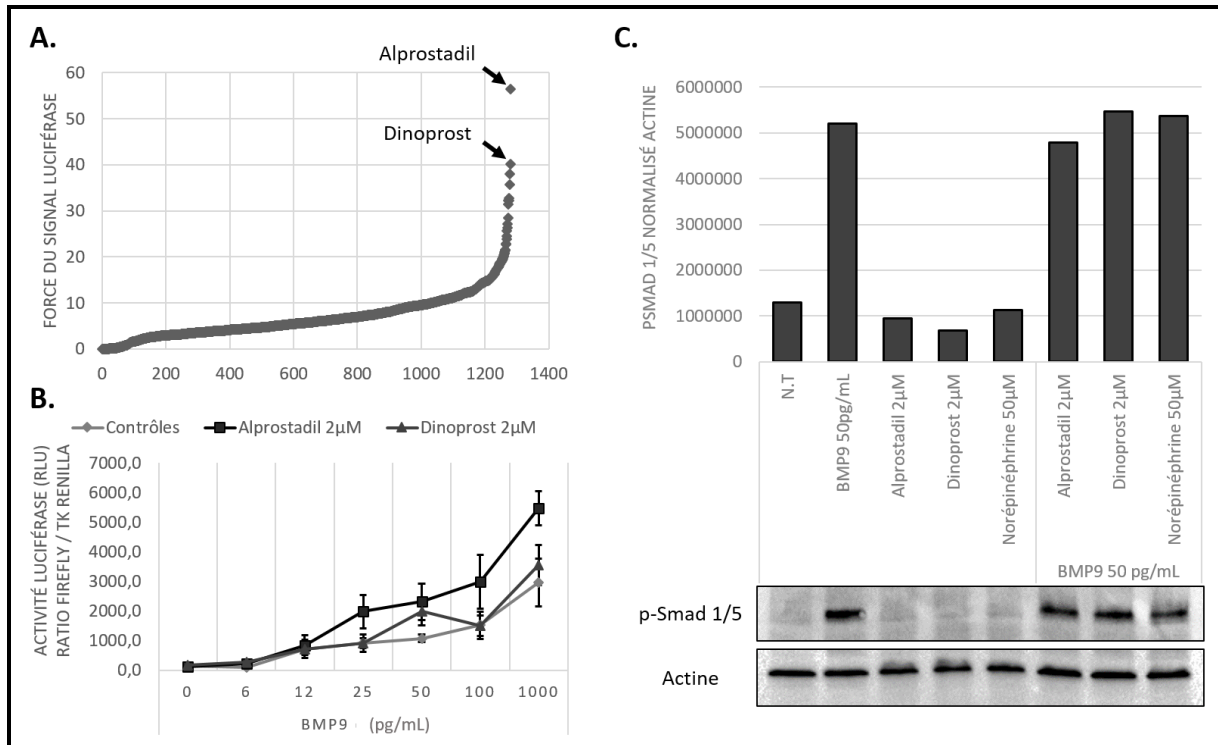


et 50 $\mu$ M en présence de BMP9 6pg/mL. À l'issue de ce criblage secondaire, nous avons pu identifier deux nouvelles molécules leaders : l'Alprostadil et le Dinoprost (Figure 41.A).

*Figure 40 : Représentation schématique du 2<sup>ème</sup> criblage de Prestwick.*

## 5.2 Résultats du criblage : Alprostadil et Dinoprost

Ces deux molécules sont respectivement des Prostaglandines E1 et F2 $\alpha$ . L'alprostadil agit principalement sur la vasodilatation en favorisant également la synthèse d'AMPc via les adénylates cyclases, et est utilisé pour dilater les vaisseaux sanguins du tissu érectile des corps caverneux et permettant l'augmentation du débit artériel. Le dinoprost, analogue de la prostaglandine F2 $\alpha$  permet quant à lui le déclenchement des contractions endométriales pour l'accouchement et également l'avortement. Cependant son action est discutée pour la formation de plaques d'athéromes, et pourrait déclencher certaines maladies cardiovasculaires. Ces molécules révèlent tout de même un intérêt particulier puisqu'étant des acteurs du tonus vasculaire.



**Figure 41 : Résultats du criblage Prestwick sur HMEC FR Luc.** (A.) : Résultats du criblage primaire, les molécules sont classées selon la force du signal produit par la Luciférase, valeur calculée par le logiciel d'analyse de criblage développé par la plateforme CMBA. (B.) : Activité Luciférase de l'alprostadil et dinoprost à 2µM avec une dose réponse de BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) activité Firefly normalisée Renilla (triplicat, n=1). (C.) : Western Blot de p-Smad 1/5 en réponse à l'alprostadil et dinoprost seuls ou avec BMP9, sur des HUVEC, avec quantification au-dessus des blots (simplicat, n=1).

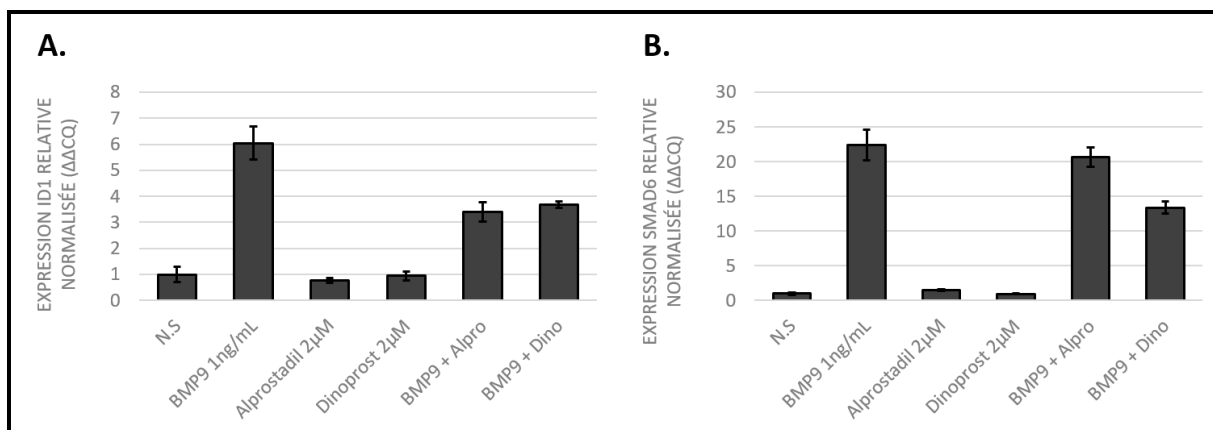
J'ai donc commencé à caractériser ces molécules. Dans un premier temps, j'ai évalué le potentiel activateur de la voie BMP9 de l'alprostadil et du dinoprost sur une réponse BRE-luc dans les HMEC FR Luc à différentes doses de BMP9. Dans cette expérience, je n'ai pas pu



reproduire l'effet du dinoprost, cependant l'alprostadil semble potentialiser la réponse BMP9 à partir de la dose 25 pg/mL (Figure 41.B). Il est intéressant de noter que cette molécule fonctionne à des doses plus faibles que les molécules préalablement testées (2µM contre 10 à 50µM).

Par la suite, j'ai mené les mêmes approches expérimentales que pour les molécules précédentes. J'ai donc cherché dans un premier temps à savoir si la phosphorylation des Smads 1/5 était affectée par ces prostaglandines, dans des HUVEC stimulées pendant 1h par du BMP9 et/ou ces prostaglandines. A nouveau, celles-ci ne phosphorylent pas les Smads 1/5 ni ne potentialisent la réponse induite par le BMP9 (Figure 41.C).

Ensuite, j'ai cherché à savoir si ces molécules activaient l'expression en ARNm des gènes cibles de la voie BMP9 sur des HUVEC en présence ou non de BMP9 pendant 4h. Si l'on regarde l'expression d'ID1 et Smad6, on constate que les molécules n'ont pas d'effet seules ou en présence de BMP9, si ce n'est un effet inhibiteur quant à l'expression d'ID1 (Figure 42). Cela est en contradiction encore une fois avec les résultats obtenus sur le BRE, mais également avec la littérature. N.W Morell *et al.* ont démontré l'effet potentialisateur de l'iloprost, un analogue de prostaglandine I2 (utilisant le récepteur PGIR2 tout comme l'alprostadil). Elle a semble-t-il un effet activateur seule sur l'expression d'ID1 mais également potentialisateur en présence de BMP9, et est utilisée actuellement pour traiter l'HTAP. Cet effet est également observable sur leur modèle cellulaire, les C2C12BRA, cellules stables myoblastiques murines. Ce modèle est cependant loin de celui que nous avons établi puisque ce modèle n'exprime pas ALK1 et provient d'une autre espèce.



**Figure 42 : Effet de l'Aprostadil et du Dinoprost sur les gènes cibles de la voie BMP9.** (A.) : Expression relative d'ID1 normalisée RPL13a ( $\delta\delta Cq$ ) en réponse à l'Alprostadil et du Dinoprost seuls ou avec BMP9, dans des HUVEC (en duplicat,  $n=1$ ). (B.) : Expression relative de Smad6 normalisée RPL13a ( $\delta\delta Cq$ ) en réponse à l'Alprostadil et du Dinoprost seuls ou avec BMP9, dans des HUVEC (en duplicat,  $n=1$ ).

## 6. Criblage manuel de Prestwick sur C2C12 BRA

### 6.1 Présentation des C2C12 BRA

Face à ces effets encore une fois contradictoires, puisque les molécules ne potentialisent l'effet de BMP9 que sur le système rapporteur BRE-luc, nous avons choisi de cribler à nouveau 39 hits issus du criblage secondaire précédent sur le modèle largement utilisé dans la littérature, le test C2C12BRA. De ce fait nous pourrons comparer les molécules considérées comme positives entre C2C12BRA et HMEC FR Luc. Ce système est plus reproductible que le test HMEC FR Luc car c'est une lignée stable exprimant BRE Luc, évitant ainsi l'étape de transfection et donc plus simple d'utilisation. Au contraire des cellules endothéliales, ce modèle n'exprime pas ALK1, mais ALK2, un peu ALK3, mais aussi les récepteurs de type 2 BMPR2, ActR2A et un peu ActR2B. Ainsi il est nécessaire d'augmenter les quantités de BMP9 pour atteindre le plateau de réponse. Ici on constate donc un début de réponse à partir de 5ng/mL et un  $EC_{50}$  se situant autour de 10ng/mL (Figure 43).

Cependant ce modèle a déjà permis l'identification de nombreux leaders comme le Tacrolimus ou encore l'Iloprost qui sont utilisés actuellement en traitement pour HHT et HTAP respectivement. Ainsi, après avoir criblé les 39 molécules sur ce modèle, j'ai pu constater des résultats différents (Figure 44). De manière surprenante, le dinoprost n'est pas sorti positif du

crible, et l'alprostadil semble avoir inhibé la réponse BMP9 (Figure 44.B). D'autre part, deux molécules sont sorties positives de ce crible, que l'on appellera molécule X et Y (celles-ci étant en cours de caractérisation) (Figure 44.A et 44.B). La molécule Y est d'ailleurs capable d'induire un signal BRE sur les C2C12 indépendamment de BMP9, mais peut également potentialiser une réponse BMP9 (données non présentées).

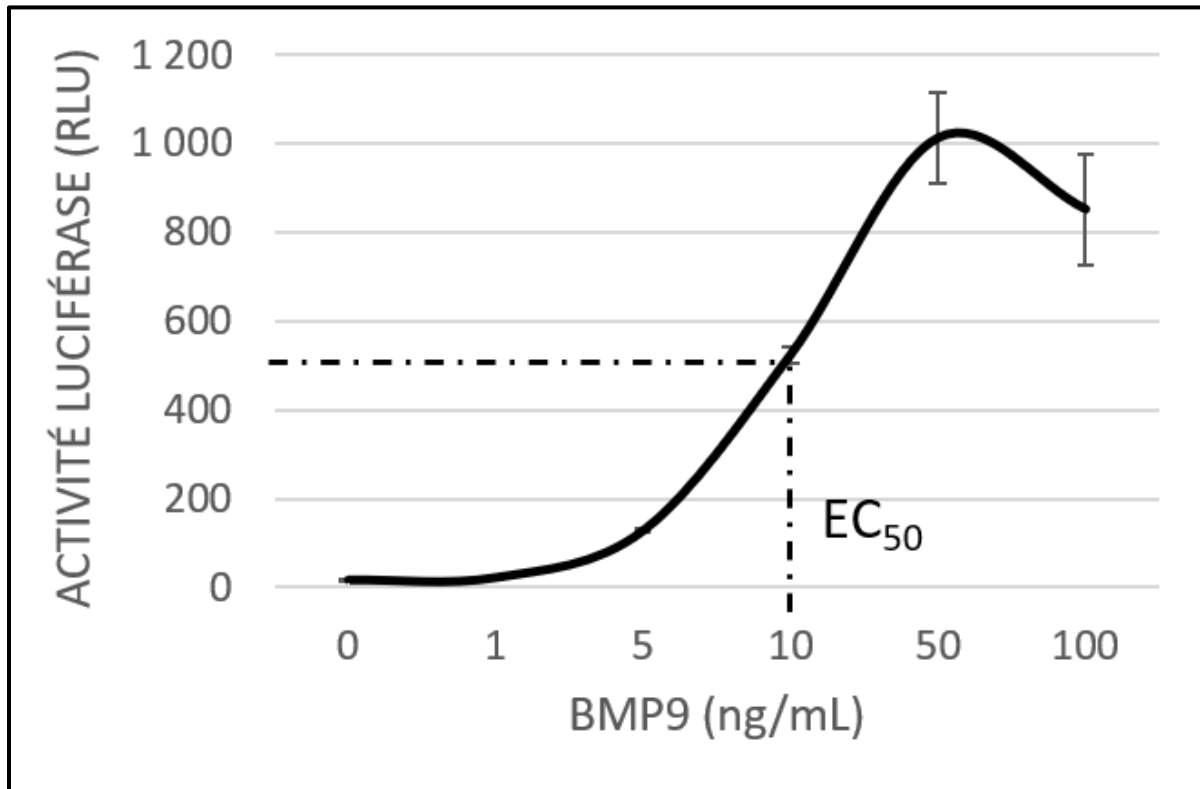
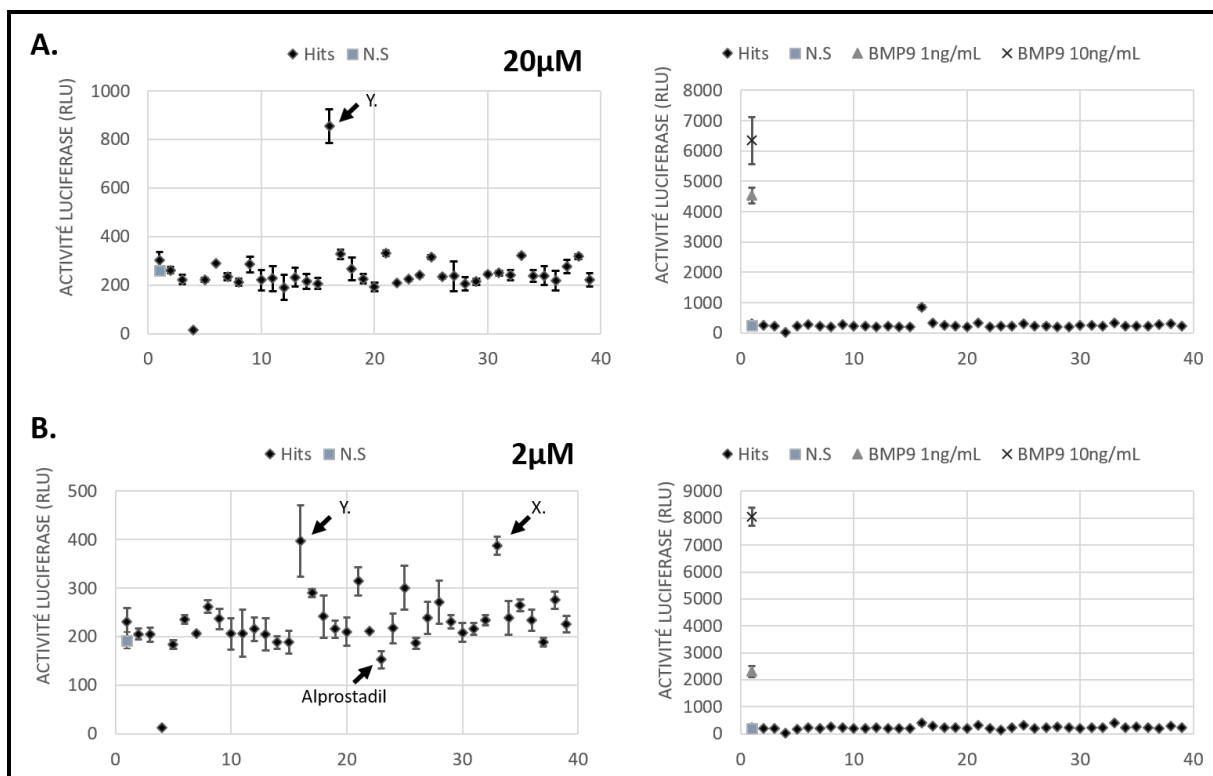


Figure 43 : Activité Luciférase de dose réponse de BMP9 en C2C12 BRA en unités relatives de luminescence (RLU) (en triplicat, n=1).



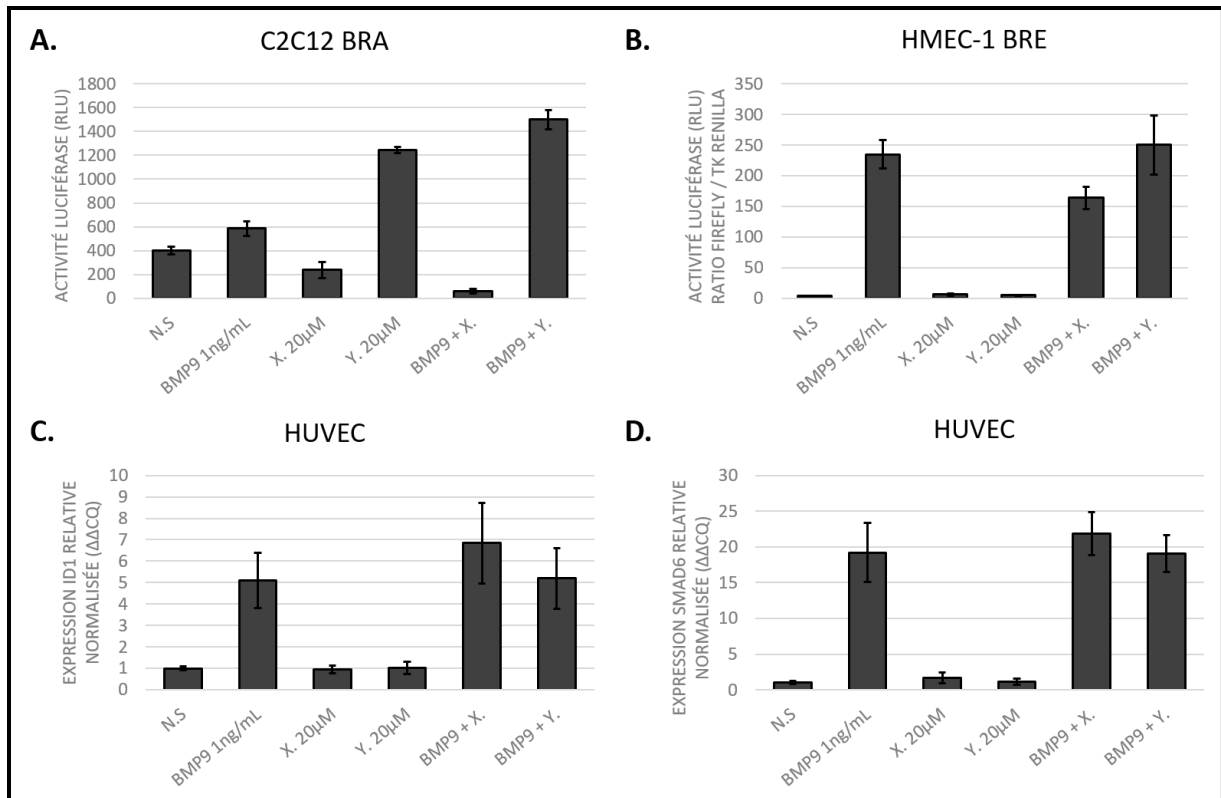
**Figure 44 : Résultats du criblage manuel des 39 candidats de Prestwick sur le modèle C2C12 BRE. (A.) : Activité Luciférase des hits de Prestwick à 20μM sans BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) (avec les contrôles positifs à droite) (en triplicat, n=1). (B.) : Activité Luciférase des hits de Prestwick à 2μM sans BMP9, en unités relatives de luminescence (RLU) (avec les contrôles positifs à droite) (en triplicat, n=1).**

## 6.2 Résultats du criblage manuel : molécules X. et Y.

J'ai ensuite tenté de caractériser ces deux molécules comme nous l'avons fait pour les précédents candidats. En refaisant l'essai BRE sur les C2C12, la molécule X n'a pas donné de résultats satisfaisants et ne stimule pas l'activité Luciférase. Par contre, la molécule Y confirme l'effet observé lors du 1er crible (Figure 45.A). J'ai souhaité savoir si l'effet observé était strictement C2C12BRA dépendant, puisque cette molécule n'est pas sortie lors du criblage sur les HMEC FR Luc. En accord avec ce premier criblage, je n'ai pas trouvé d'effet inducteur de ces deux molécules avec le test HMEC FR Luc (Figure 45.B). Nous avons essayé ces molécules sur la régulation de l'expression des ARNm d'ID1 et Smad6 sur des HUVEC, et nous n'avons encore une fois aucune modification significative de leur expression par ces deux molécules (Figure 45.C et 45.D). Ces résultats iraient dans le sens d'une activation spécifique du type

cellulaire. Cependant, on ne peut pas non plus écarter un effet direct sur les cellules C2C12 comme sur le nombre de cellules qui pourrait expliquer cette augmentation de RLU.

Comme dit précédemment, les C2C12BRA ont été très utilisées pour cribler des molécules capables de restaurer la voie BMP9 et ont permis la découverte de plusieurs candidats pouvant être utilisés pour atténuer HHT ou HTAP, ou même les deux (exemple du tacrolimus). Cependant, les HMEC-1 sont plus adéquates pour représenter les voies signalétiques mises en jeu dans ces pathologies puisque HHT et HTAP sont dues à des dysfonctions endothéliales selon l'hypothèse actuelle. De même, les deux modèles présentent la même construction BRE, l'un en stable et l'autre en expression transitoire. Il semble alors curieux que les résultats diffèrent d'un type cellulaire à l'autre, ou alors d'une construction BRE à l'autre. Il pourrait être intéressant de transfecter des C2C12 avec pGL3 BRE Luc et TK Renilla, éventuellement ALK1 afin de discriminer s'il s'agit du type cellulaire ou de la construction plasmidique. À priori, une molécule activant une luciférase sous la dépendance d'un BRE (qui est le même) devrait le faire dans tous les modèles possédant ce dit BRE. Or ce n'est pas le cas ici, montrant la limite de ce système et des modèles employés. Il est également à noter que le BMP9 fonctionne parfaitement dans tous les modèles, à EC<sub>50</sub> différents bien sûr de par le panel de récepteurs présents dans les modèles. Nous pourrions alors nous demander, par exemple concernant la molécule Y, si celle-ci active une voie particulière dans les C2C12BRA capable d'activer un BRE mais qui n'est pas présente ou en moindre intensité dans les HMEC-1. Des analyses sont en cours pour évaluer la molécule Y en p-Smad 1/5 et expression ID1 – Smad6 dans les C2C12 pour s'assurer d'une spécificité du modèle cellulaire. Cependant, j'estime que les deux modèles pourraient être complémentaires compte tenu de la problématique de HHT et HTAP, afin de s'assurer du bon fonctionnement d'un candidat potentiel sur la voie BMP9. On pourrait alors s'assurer qu'un candidat leader devrait activer les deux BRE dans les deux modèles.



**Figure 45 : Caractérisation des molécules X. et Y.** (A.) : Activité Luciférase en réponse aux molécules X. et Y. seules ou avec BMP9, de C2C12BRA, en unités relatives de luminescence (RLU) (en triplicat, n=1). (B.) : Activité Luciférase en réponse aux molécules X. et Y. seules ou avec BMP9, dans le modèle HMEC FR Luc, en unités relatives de luminescence (RLU) (en triplicat, n=1). (C.) : Expression relative d'ID1 normalisée RPL13a ( $\delta\delta Cq$ ) en réponse à la molécule X. et Y. seules ou avec BMP9, dans des HUVEC (en duplicat, n=1). (D.) : Expression relative de Smad6 normalisée RPL13a ( $\delta\delta Cq$ ) en réponse à la molécule X. et Y. seules ou avec BMP9, dans des HUVEC (en duplicat, n=1).

## Matériels et Méthodes

### **Culture cellulaire :**

**Les HMEC-MetLuc** (Human dermal Microvasculer Endothelial Cells) sont cultivées en DMEM SVF10% puromycine 0.6 µg/mL. Ces cellules sontensemencées en DMEM SVF1% puromycine 0.6µg/mL à 50 000 cellules par puit en plaque 96 puits pour activité MetLuc, à 250.000 en plaque 6 puit pour ARN et Protéines, et à 1.000.000 en boîte de Pétri.

**Les HMEC-1** sont cultivées en DMEM SVF10%. Ces cellules sontensemencées en DMEM SVF1% à 50.000 cellules par puit en plaque 96 puits pour activité BRE Luc, à 250.000 en plaque 6 puits pour ARN et Protéines, et à 1.000.000 en boîte de Pétri. Les transfections et stimulations associées sont réalisées en Opti-MEM de Gibco sans sérum.

Solutions utilisées : DMEM Gibco Pyruvate + 4.5 g/L D-Glucose ; DPBS sans CaCl<sub>2</sub> ni MgCl<sub>2</sub> Gibco ; Trypsine-EDTA 0.05% Gibco ; Opti-MEM Gibco.

**Les HUVEC** (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont cultivées en EBM-2 SVF 5% de Lonza avec suppléments et facteurs de croissance. Ces cellules sontensemencées dans le même milieu à 200.000 en plaque 6 puits pour ARN et Protéines, et à 375 000 cellules en flasque 75mm<sup>3</sup>.

Solutions utilisées : EBM-2 et (hEGF, Hydrocortisone, GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B), FBS (Fetal Bovine Serum) 25 ml, VEGF, hFGF-B, R3 -IGF-1, Ascorbic Acid) de Lonza ; Trypsine EDTA de Lonza ; Solution de Neutralisation de Trypsine (TNS) de Lonza.

**Les C2C12 BRE** sont cultivées en DMEM/F-12 + GlutaMAX et SVF 10% + Pénistreptomycine 1% de Gibco. Les cellules sontensemencées à 1.5 millions en boîte de Pétri, et 15 000 par puits en plaque 96 puits pour un test BRE Luc.

### **Clonage plasmide :**

J'ai personnalisé le plasmide pLVX en y insérant un site MluI par mutagenèse dirigée afin de faciliter l'insertion de la séquence ID1-BRE provenant de pGL3 BRE Luc. Ainsi les sites MluI du pLVX et de l'insert forment des bouts cohésifs, les autres extrémités formant des bouts francs avec les sites HindIII et BamHI. On a alors une insertion dirigée de l'insert dans le plasmide. La

ligation se fait selon le protocole Quick Ligation Protocol M2200 de NEB. Les plasmides sont ensuite amplifiés dans une souche *E.Coli* DH5 $\alpha$  traitée ampicilline, puis purifiés en MaxiPrep selon le protocole Macherey-Nagel. La qualité des plasmides est vérifiée par coupure EcoRI/SpeI donnant une bande à 1200pb. Les plasmides sont ensuite séquencés pour s'assurer de la présence du BRE dans le pLVX.

### **Western Blot :**

Les cellules sontensemencées la veille en plaque 6 puits aux quantités adéquates. Le lendemain, les cellules sont déprivées 2h avec leur milieu respectif seul, puis stimulées 1h, et arrêtées avec 100 $\mu$ L de RIPA et 1 $\mu$ L d'inhibiteur protéase, 1 $\mu$ L d'inhibiteur phosphatase P0044 et P5726 de Sigma dans chaque puit. Les protéines sont dosées selon le protocole Kit Micro BCA Thermo Scientific. La migration des protéines s'effectue sur des gels pré-coulés BioRad mini-Protean TGX Stain Free Gels 4-20% puis transférés sur membrane nitrocellulose avec un Bio-Rad Trans-blot Turbo Transfer System.

### Anticorps :

- Phospho-Smad1/5 (Ser463/465) (41D10) Rabbit mAb, Cell Signaling. Dilution 1/1000.
- Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin Clone AC-15 Mouse mAb, Sigma. Dilution 1/5000.

### **RT-qPCR :**

Les cellules sontensemencées la veille en plaque 6 puits aux quantités adéquates. Le lendemain, les cellules sont déprivées 2h avec leur milieu respectif seul, puis stimulées 4h, et arrêtées avec 100 $\mu$ L de tampon RA1 et 2 $\mu$ L de TCEP fourni par le kit Nucleospin RNA XS de Macherey-Nagel. Les RT sont faites selon le protocole Bio-Rad iScript cDNA Synthesis, puis les qPCR sont faites selon le protocole Kit qPCR Master Mix Promega avec SYBR Green.

### Primers utilisés :

- HPRT
  - hHPRT 08-25: ATG GAC AGG ACT GAA CGT CTT GCT
  - hHPRT 08-26: TTG AGC ACA CAG AGG GCT ACA ATG
- RPL13a
  - RPL13aF650: TTA ATT CCT CAT GCG TTG CCT GCC



- RPL13aR771: TTC CTT GCT CCC AGC TTC CTA TGT
- ID1
  - Id1-F355: CCC CAG AAC CGC AAG GTG AGC
  - Id1-R547: CAG GAA CGC ATG CCG CCT CG
- Smad6
  - hSmad6-1769: CCT ACT CTC GGC TGT CTC CT
  - hSmad6-1865: GAA TTC ACC CGG AGC AGT GA
- ALK1
  - ALK1mbh748: CGA GCT GGG AGA GTC CAG T
  - ALK1mbh828: CAG TCA CTG TCC AGG AGG TC
- ALK2
  - ALK2\_forward: CAA CCA AGA ACG CCT CAA TC
  - ALK2\_backward: ATA CCT GCC TTT CCC GAC AC
- ALK3
  - ALK3-F1608: GGA AAG CCC GCA ATT GCT CAT CG
  - ALK3-R1756: CCC ACC CTG GTA TTC AAG GGC AC

## **Criblage :**

### Dosage *Metridia* Luciférase

Jour 1 : Les plaques Greiner 96 puits white flat bottoms sont coatées en gélatine 0.1% (100µL par puit) pendant 30min à 37°C. Puis, la gélatine est aspirée, et les plaques sont rincées 2 fois au DPBS -/-. Dans un second temps, les HMEC MetLuc sont préparées pour l'ensemencement. Une boîte de Pétri d'HMEC MetLuc est rincée deux fois au DPBS -/- puis on y ajoute 2mL de Trypsine Gibco. La trypsine est neutralisée avec 3mL de DMEM SVF10%. Les cellules sont ensuite centrifugées 5min à 1000RPM et reprises dans du DMEM SVF1%. Les cellules sont comptées au TC20 de Bio-Rad. Les cellules sont ensuite ensemencées au multidrop sous agitation à 50 000 cellules par puits dans les plaques 96 puits Greiner white flat bottom. Les plaques reposent d'abord 30 minutes à température ambiante pour sédimenter les cellules

puis incubent à 37°C CO<sub>2</sub> 5% pour la nuit (permet d'éviter les mouvements de convection dans l'étuve et de repousser les cellules sur les bords du puit)

Jour 2 : Le processus de criblage s'automatise entièrement à partir de ce jour. Les plaques sont prises par le robot pour être mise sur le laveur de la plateforme, capable d'aspirer 96 puits simultanément. Le laveur effectue 2 rinçages au DPBS -/- puis le robot déplace la plaque sur le slot de dépôt de milieu. Le robot ajoute alors 100µL de DMEM vierge avec la tête de 96 pointes pour dépriver les cellules. Les plaques sont remises à l'étuve pour 6h. Après déprivation, le robot replace les plaques sur le laveur et effectue de nouveaux 2 rinçages au DPBS -/-. Les molécules sont reprises dans du DMEM vierge en concentration 10X (10µL) et diluée avec du BMP9 13.75pg/mL (90µL) pour donner en concentration finale BMP9 12.5pg/mL avec les molécules 1X. Le robot dispense les contrôles DMEM SVF10% (100µL) et DMEM + BMP9 12.5pg/mL (100µL) ; puis le BMP9 13.75pg/mL (90µL) et les molécules 10X (10µL) dans les puits tests. Les plaques sont remises à l'étuve pour la nuit.

Jour 3 : Le robot place les plaques sur le slot de dépôt de milieu. Avec la tête 96 pointes, le robot prélève 20 µL de surnageants de chaque puit dispensés dans une plaque à fond blanc pour la lecture. Les plaques sont ensuite déposées dans le lecteur TECAN Infinite M1000 puis lues en single channel. La luciférase utilise le substrat Renilla de Promega Stop'n'Glo ainsi que son substrat Renilla 50X. Le substrat est injecté à un volume de 90µL par puit, et le lecteur effectue une accumulation de photons sur 10 secondes. Les cellules peuvent être quantifiées au WST-1 (Roche) ou PrestoBlue (ThermoFisher) pour faire une normalisation cellulaire (utilisé pour le criblage secondaire uniquement).

#### pGL3 BRE Luc / TK Renilla

Jour 1 : Les plaques Greiner 96 puits white flat bottoms sont coatées en gélatine 0.1% (100µL par puit) pendant 30min à 37°C. Puis, la gélatine est aspirée, et les plaques sont rincées 2 fois au DPBS -/-. Dans un second temps, les HMEC sont préparées pour l'ensemencement. Une boîte de Pétri d'HMEC est rincée deux fois au DPBS -/- puis on y ajoute 2mL de Trypsine Gibco. La trypsine est neutralisée avec 3mL de DMEM SVF10%. Les cellules sont ensuite centrifugées 5min à 1000RPM et reprises dans du DMEM SVF1%. Les cellules sont comptées au TC20 de Bio-Rad. Les cellules sont ensuite ensemencées au multidrop sous agitation à 50 000 cellules

par puits dans les plaques 96 puits Greiner white flat bottom. Les plaques reposent d'abord 30 minutes à température ambiante pour sédimenter les cellules puis incubent à 37°C CO<sub>2</sub> 5% pour la nuit (permet d'éviter les mouvements de convection dans l'étuve et de repousser les cellules sur les bords du puit).

Jour 2 : Le processus de criblage s'automatise entièrement à partir de ce jour. Les plaques sont prises par le robot pour être mise sur le laveur de la plateforme, capable d'aspirer 96 puits simultanément. Le laveur effectue 2 rinçages au DPBS +/- puis le robot déplace la plaque sur le slot de dépôt de milieu. Le robot ajoute alors 50µL de mix de transfection avec la tête de 8 pointes pour transférer les cellules. Ce mix contient en quantité par puit 25ng de plasmide TK Renilla, 75ng de plasmide pGL3 BRE Luc et 0.5 µL de Lipofectamine 2000 et Opti-MEM qsp 50µL. Les plaques sont remises à l'étuve pour 6h. Après transfection, le robot replace les plaques sur le laveur et aspire seulement les mix de transfection. Les molécules sont reprises dans du Opti-MEM vierge en concentration 10X (10µL) et diluée avec du BMP9 6.6pg/mL (90µL) pour donner en concentration finale BMP9 6pg/mL avec les molécules 1X. Le robot dispense les contrôles Opti-MEM + BMP9 1000pg/mL (100µL) et Opti-MEM + BMP9 6pg/mL (100µL) ; puis le BMP9 6.6pg/mL (90µL) et les molécules 10X (10µL) dans les puits tests. Les plaques sont remises à l'étuve pour la nuit. Les plaques seront congelées le lendemain puis lues extemporanément par soucis de respecter le même temps de stimulation pour chaque plaque. Celui-ci place les plaques sur le laveur puis aspire les milieux de stimulation. Le robot dépose ensuite les plaques sur le slot de dépôt pour y ajouter 20µL de tampon de lyse fourni par Promega. Les plaques sont ensuite agitées pendant 5 minutes à 600RPM puis mises à – 80°C.

Jour 3 : Les plaques sont donc décongelées une à une puis placées dans le carrousel du robot. Les plaques sont ensuite déposées dans le lecteur TECAN Infinite M1000 puis lues en dual channel. Le lecteur dispense tout d'abord 90µL de substrat Firefly et effectue une acquisition totale de photons sur 10 secondes. Puis, dispense 90µL de substrat Renilla et effectue une acquisition totale de photons sur 5 secondes. Le signal Firefly est donc normalisé avec celui Renilla.

### C2C12 BRE (Criblage manuel) :

Les cellules sontensemencées la veille en DMEM/F-12 SVF 10% à 15 000 cellules par puit en plaques 96 puits Greiner Flat Bottom White. Le lendemain, les milieux sont aspirés et rincés au DPBS -/- 2 fois puis on ajoute du DMEM/F-12 vierge pour dépriver 6h. Le soir, le milieu de déprivation est aspiré puis les milieux contenant les molécules d'essais sont ajoutées, et incubées sur la nuit. Le lendemain, Les milieux sont aspirés puis on ajoute 20µL de tampon de lyse de Promega et on agite les plaques à 600 RPM pendant 5 minutes. Les lectures sont effectuées sur le Lecteur TECAN Spark du laboratoire, en comptant un nombre total de photons sur 10 secondes d'acquisition en single channel, en utilisant uniquement le substrat Firefly.

## Discussions & Perspectives

En conclusion, ces 3 années de thèse m'ont fait réaliser les différents challenges imposés par la mise en place d'un système de criblage nouveau, pertinent et fonctionnel, mais aussi la concurrence en place dans ce domaine. En effet j'ai été confronté aux limites que pouvait proposer un modèle rapportant une voie de signalisation. Nous regardons en général une voie en particulier, ici celle induite par BMP9, en cherchant à activer spécifiquement les acteurs moléculaires impliqués dans celle-ci. Cependant la physiologie cellulaire est beaucoup plus complexe et met en jeu tout un panel moléculaire permettant l'homéostasie de la cellule. Cribler pour rétablir une voie de signalisation est me semble-t-il l'un des criblages les plus complexes. En effet, la plupart des criblages se basent soit sur la mortalité cellulaire (par exemple en cancérologie, on peut se servir de cellules mammaires MCF10A pour trouver des molécules induisant leur mort et ainsi identifier de potentielles thérapies du cancer du sein), soit sur des essais *in vitro* en cherchant des inhibiteurs d'interactions moléculaires. Ainsi un criblage cellulaire visant à activer une voie de signalisation en particulier est un défi à relever qui nécessite une préparation solide préalable pour anticiper les problèmes possibles.

La lignée HMEC-MetLuc a été difficile à mettre en place. En effet une lignée stable est toujours compliquée à élaborer compte tenu du facteur aléatoire de l'insertion génomique de lentivirus. La création et l'optimisation du plasmide pLVX BRE *Metridia* Luciférase a pris approximativement 4 mois, dû aux difficultés d'insertion de la séquence BRE dans le pLVX basic, ce qui nous a fait choisir la solution de mutagénèse dirigée pour insérer un site MluI pour forcer l'insertion du BRE. Suite à cela nous avons pu tester l'efficacité du plasmide en transfection transitoire, et celui-ci, malgré une sensibilité plus faible que le pGL3 BRE Luc que nous utilisons en routine au laboratoire, répond correctement à BMP9 et m'a permis d'établir la lignée HMEC-MetLuc. Nous avons donc ici un test fonctionnel répondant au BMP9 et également au Sérum de Veau Fœtal (SVF) qui contient différentes BMPs. Ainsi les réponses obtenues comme indiqué précédemment proviennent de ALK1, ALK2 et ALK3. De plus, nous avons constaté que la lignée génétiquement modifiée a conservé l'expression des récepteurs ALK1, ALK2 et ALK3 de la lignée d'origine HMEC-1, bien qu'en moindre quantité, en concomitance avec une diminution observée de la phosphorylation des Smads. Il semblerait que l'infection par les virions a modulé les niveaux d'expression de ces récepteurs, et peut-

être d'autres facteurs cellulaires. De plus, la lignée croît moins vite que celle d'origine HMEC-1, mais ceci est probablement dû au traitement par la puromycine 0.6µg/mL, correspondant à une dose létale pour des HMEC-1 ne possédant pas le gène de résistance à cet antibiotique (de la mort cellulaire est également observée pendant la culture sur les HMEC-MetLuc). Une dose moins forte de puromycine pourrait être utilisée pour avoir une culture cellulaire optimale en vérifiant que l'activité *Metridia* Luciférase ne diminue pas avec les cycles cellulaires. Par ailleurs, il a été difficile d'isoler un clone cellulaire pour obtenir une réelle lignée stable, j'ai donc choisi d'utiliser un pool de cellules transfectées. Au final, le gène rapporteur inséré dans cette lignée répond très faiblement au BMP9 et nous a fait perdre en sensibilité. Ainsi, nous avons développé un outil de criblage qui rapporte la voie BMP9 en utilisant une luciférase sécrétée, ce qui nous a semblé intéressant pour étudier en parallèle les voies de signalisation intracellulaires associées (comme je l'ai montré précédemment, en prouvant l'effet de la bacitracine en cinétique tant sur l'activité *Metridia* Luciférase dans les surnageants que p-Smad 1/5 dans les lysats cellulaires). Cependant, ce modèle génère des faux positifs comme la bacitracine qui affecte des fonctions cellulaires autres que la voie de signalisation étudiée, ici probablement la sécrétion. Néanmoins, cette expérience nous a permis de proposer un rôle pro-sécrétoire pour la bacitracine qu'il serait intéressant de confirmer par d'autres expériences. Compte tenu de l'effet induit par la bacitracine, et des fortes valeurs de luminescence que donne le SVF, il serait possible que ce dernier influe également sur la synthèse protéique de la *Metridia* Luciférase voire de sa sécrétion. Par manque de temps, Je n'ai pas pu effectuer de cinétique courte avec le SVF, ni d'essai avec CHX et DRB sur des HMEC-MetLuc stimulées au SVF, mais ces tests seraient très intéressants pour caractériser davantage la réponse observée.

Le modèle HMEC FR Luc est bien caractérisé et est utilisé largement pour quantifier une activité BMP9. Cependant la mise au point de ce système a été longue et difficile, cette fois-ci non d'un point de vue cellulaire, mais plutôt d'un point de vue physico-chimique des composants utilisés. En effet il faut tout d'abord que la transfection soit homogène dans tous les puits afin d'être le plus reproductible possible et d'éviter les variations inter-puits. Une manipulation fine est possible à la main, cependant le robot travaille de manière un peu moins raffiné (mais certes de manière plus reproductible), il faut alors ajuster les vitesses de pipetage pour trouver celles qui se rapprochent le plus de ce que je fais manuellement. De plus, nous

utilisons de la lipofectamine 2000 pour transfecter les cellules, celle-ci adsorbe sur les surfaces en plastique, et a donc nécessité beaucoup de mise au point quant au réservoir à utiliser, les pointes de pipetage à utiliser (graphite) ainsi que la hauteur des têtes de pipetage et la vitesse d'aspiration/éjection du volume pour ne pas induire de phénomènes aérosols. Ce système nécessite une pratique méticuleuse des réactifs, mais est tout de même sensible et nous a permis d'avoir plus confiance quant à l'obtention de potentiels candidats. En effet, certaines molécules potentialisaient l'activité luciférase Firefly, sans modifier l'activité Renilla (ce qui constitue un Hit positif), parfois inhibaient l'activité luciférase Firefly et pas Renilla (Constituant un inhibiteur potentiel), mais parfois activaient les deux luciférases auquel cas nous pouvions constater un faux positif, agissant directement sur l'activité de l'enzyme ou sa synthèse. Cependant, c'est une technique qui est plus coûteuse de par les réactifs utilisés (Lipofectamine 2000 et plasmides rapporteurs, OptiMEM, 2 Substrats de lecture pour Firefly et Renilla, tampon de lyse). Il faut également s'assurer au préalable de la qualité des plasmides utilisés, travailler dans des conditions stériles au robot (les antibiotiques ne peuvent pas être utilisés à partir de l'étape de transfection puisqu'ils peuvent gêner cette étape) et s'assurer de la bonne transfection des plasmides pour être le plus reproductible et éviter les variations entre les puits.

Ce système nous a permis également de confirmer l'efficacité du modèle HMEC-MetLuc, en essayant d'abord la bacitracine ainsi que les molécules obtenues lors du criblage Prestwick sur HMEC-MetLuc. Aucune des molécules identifiées sur HMEC-MetLuc n'a donné de résultats positifs sur le modèle HMEC FR Luc. Ceci est intéressant puisque nous pouvons ainsi confirmer l'efficacité d'un candidat sur différents modèles rapportant la voie BMP9 et identifier de potentiels faux positifs. Le modèle HMEC FR Luc n'est cependant pas dénué de défauts. Des contradictions subsistent, comme les activations observées par les agonistes  $\beta$ 2 sur la luciférase et non sur l'expression génique d'ID1. Nous n'avons pas pu expliquer l'absence d'un effet direct sur la voie de signalisation tel que l'ont montré Ohta *et al.* (j'ai constaté le même problème avec les prostaglandines, censées favoriser la synthèse d'AMPc), hormis une diminution de l'expression de la Smad inhibitrice Smad6, qui pourrait ainsi prolonger l'effet de la voie BMP9 et donc produire davantage de luciférase. Auquel cas, nous pouvons nous questionner sur la pertinence de proposer les agonistes  $\beta$ 2 comme activateurs de la voie. Mais il me semble que de retirer une régulation négative endogène nécessaire ne soit pas judicieux.

Même si les patients sont haplo-insuffisants et ont donc probablement une signalisation BMP9 diminuée, un maintien d'une voie de signalisation pourrait être *in fine* délétère. Une autre alternative serait de regarder la cinétique des niveaux d'expression d'ID1, pour voir si les agonistes  $\beta$ 2 sont capables d'augmenter les niveaux protéiques d'ID1 ou encore de prolonger l'effet de BMP9 sur son expression génique. La régulation de la voie pourrait au final se faire à travers l'internalisation des récepteurs. Des tests phénotypiques peuvent également être réalisés sur des cellules endothéliales pulmonaires de patients que le laboratoire possède par la collaboration avec l'Unité Inserm 0999 de Marc Humbert, afin d'investiguer si ces molécules ont un effet bénéfique vis-à-vis des pathologies HHT et HTAP.

Les contradictions obtenues quant à l'activité luciférase potentialisée et l'expression d'ID1 non affectée sont difficiles à comprendre et posent un problème de fiabilité du modèle. En effet, les différents succès de criblage notamment le tacrolimus ou encore BUR1, affectent la phosphorylation des Smads 1/5 et sont en concordance avec l'activité luciférase observée. Il est de même avec l'iloprost, qui est capable d'activer l'expression d'ID1 seul et même de potentialiser celle induite par BMP9. Les modèles utilisés n'étaient d'ailleurs pas particulièrement représentatifs de la pathologie (C2C12 : myoblastes murins ; hESC dérivés en cellules endothéliales codant une luciférase, nécessitant d'ailleurs une caractérisation afin de constater la présence de marqueurs endothéliaux). Ces modèles ont cependant permis le repositionnement de molécules (notamment C2C12BRA) actuellement en essai clinique pour améliorer les conditions de vie de patients (Ex. : Tacrolimus).

Le crible manuel sur le modèle C2C12BRA des 39 hits positifs de la chimiothèque Prestwick sur le modèle HMEC FR Luc nous a également donné des résultats surprenants. En effet, aucune des molécules positives sorties en fin de crible sur HMEC-1 (Alprostadil et Dinoprost) ne sont sorties positives sur C2C12 (Si ce n'est un effet inhibiteur de l'Alprostadil). Cependant nous avons identifié 2 molécules qui fonctionnent sans BMP9 et potentialisent également la réponse BMP9, sans pour autant reproduire le même effet sur le modèle HMEC FR Luc, ni en expression génique ID1/Smad6 sur des HUVEC. Il faudrait alors discriminer quel modèle est le mieux adapté au repositionnement moléculaire et se questionner sur les raisons de telles variations (cellules myoblastiques murines contre cellules endothéliales humaines). Ou encore de la construction qui permettrait de rapporter l'activité BMP9 (les constructions BRE viennent toutes deux d'une partie du promoteur d'ID1). Il est à noter que les C2C12



n'expriment pas ALK1, récepteur de plus haute affinité pour BMP9. Par ailleurs, comme HHT est une pathologie présentant une haplo-insuffisance en ALK1, il est plus pertinent de travailler sur un modèle qui le possède, à savoir des cellules endothéliales. Même s'il est vrai que les candidats actuels repositionnés sont issus d'un criblage C2C12 (avec caractérisation secondaire sur des cellules endothéliales pour confirmer les résultats). Cependant nous n'avons pas réussi à établir un modèle endothélial permettant de découvrir des candidats ayant les caractéristiques attendues et que l'on retrouve dans la littérature pour des molécules validées. Par ailleurs, le modèle C2C12 est une lignée stable issue d'un clone, et permet ainsi d'avoir une bonne reproductibilité inter-puits et qui a fait ses preuves dans la littérature actuelle. Elle est également plus simple d'utilisation, et de ce fait moins coûteuse en réactifs pour le crible.

Ainsi les modèles proposent des résultats différents entraînant des problématiques différentes. Les données contradictoires que nous avons observées au sein d'un même modèle et entre différents modèles cellulaires sont aujourd'hui sans réponse, et nous essayons encore actuellement de comprendre leurs mécanismes d'actions potentiels sur des voies de signalisation croisant probablement avec la voie BMP9 (comme par exemple des agonistes  $\beta_2$ , qui ont été identifiés avec le promoteur endogène ID1 mais montrant une efficacité tant sur la luciférase que sur l'expression du gène même). Ainsi je pense que ces candidats ne sont pas à éliminer, et qu'ils pourraient encore trouver leur place parmi la pharmacopée potentielle pour traiter HHT et HTAP. En effet, l'Albutérol (ventoline) serait très bien adapté de par son mode d'administration non invasif directement par voie inhalée buccale. Il est cependant vrai que ce dernier peut induire une tachycardie, qui est délétère au patient, mais un agoniste ou un mode d'administration adapté pourrait peut-être palier cet effet. Des analyses supplémentaires pourraient également être effectuées sur des modèles cellulaires autres, comme les cellules de patients présentant des mutations *ACVLR1* ou *BMPR2*.

Ainsi, développer un outil de criblage, conduisant à l'identification d'un candidat potentiel puis à sa caractérisation n'est pas chose facile. Il était en effet judicieux de proposer un nouveau modèle de nature endothéliale du point de vue des problématiques proposées pour HHT et HTAP (également établi pour l'identification de BUR1). Cependant c'est un travail difficile qui nécessite d'anticiper au préalable tous les troubles possibles afin de savoir

précisément si une molécule est un réel candidat ou non. Notre première expérience sur HMEC-MetLuc nous a fait prendre conscience des erreurs faites et des caractérisations à mettre en place afin de s'assurer si une molécule est un faux positif du crible ou non. Ceci nous a permis de développer et mettre au point l'outil HMEC FR Luc avec plus de rapidité et d'expertise. Les essais que nous avons également réalisés sur le modèle C2C12 nous ont permis de voir les limites entre les différents modèles que nous avons pu employer pour les criblages. Ainsi il est difficile de trancher de manière précise quant au choix du modèle, même si le modèle C2C12 a déjà fait ses preuves, d'autres équipes de recherche dont la nôtre s'attèlent à développer des modèles endothéliaux pertinents pour cribler des molécules dans ces pathologies.

Néanmoins, d'autres modèles de cribles phénotypiques peuvent être développés en se basant sur des données physiologiques, et ceci semblerait plus propice à l'investigation de nouveaux traitements. En effet, Otten C. *et al.* (2018) ont effectué un criblage phénotypique concernant les malformations cavernieuses cérébrales. Trois modèles sont mis à l'étude possédant chacun des mutations impliquées dans la pathologie, et présentant un phénotype distinct provoqué par celles-ci. On observe alors une mort précoce chez *C. elegans*, un « ballooning heart » chez *Danio rerio* (poisson zèbre), et une malformation cavernieuse apparente sur le cervelet de la souris. Ils utilisent également un modèle de cellules HUVEC transfectées avec des siRNA induisant ces mutations permettant d'observer un phénotype « allongé » des cellules par rapport à une condition contrôle, également établi précédemment sur des HMVECd par Gibson *et al.* en 2015 (Gibson, 2015). En faisant ainsi, cela leur a permis d'identifier 5 molécules ayant un effet restauration de fonction sur les modèles *C. elegans* (survie), Zebrafish (perte de l'hypertrophie cardiaque) et HUVEC (cellules à morphotype normal). Cependant, leur premier candidat fut au final l'Indirubin-3-monoxime qui avait un effet positif uniquement sur le poisson zèbre et HUVEC, mais avec un réel sauvetage des malformations cérébelleuses sur la souris. Ceci leur a permis par la suite d'identifier la voie de signalisation affectée (puisque la molécule est issue d'une banque médicamenteuse connue : LOPAC – Selleck Chem) et d'investiguer son action moléculaire. Ceci constitue pour moi un outil précieux, puisque la molécule étudiée a un effet sur plusieurs modèles phénotypiques, un réel potentiel sauveteur sur des modèles représentatifs de la pathologie.

Il est, je pense, plus judicieux d'effectuer une analyse dite en entonnoir : analyser les variables phénotypiques, puis réduire finement jusqu'à la cellule, et enfin la voie de signalisation.

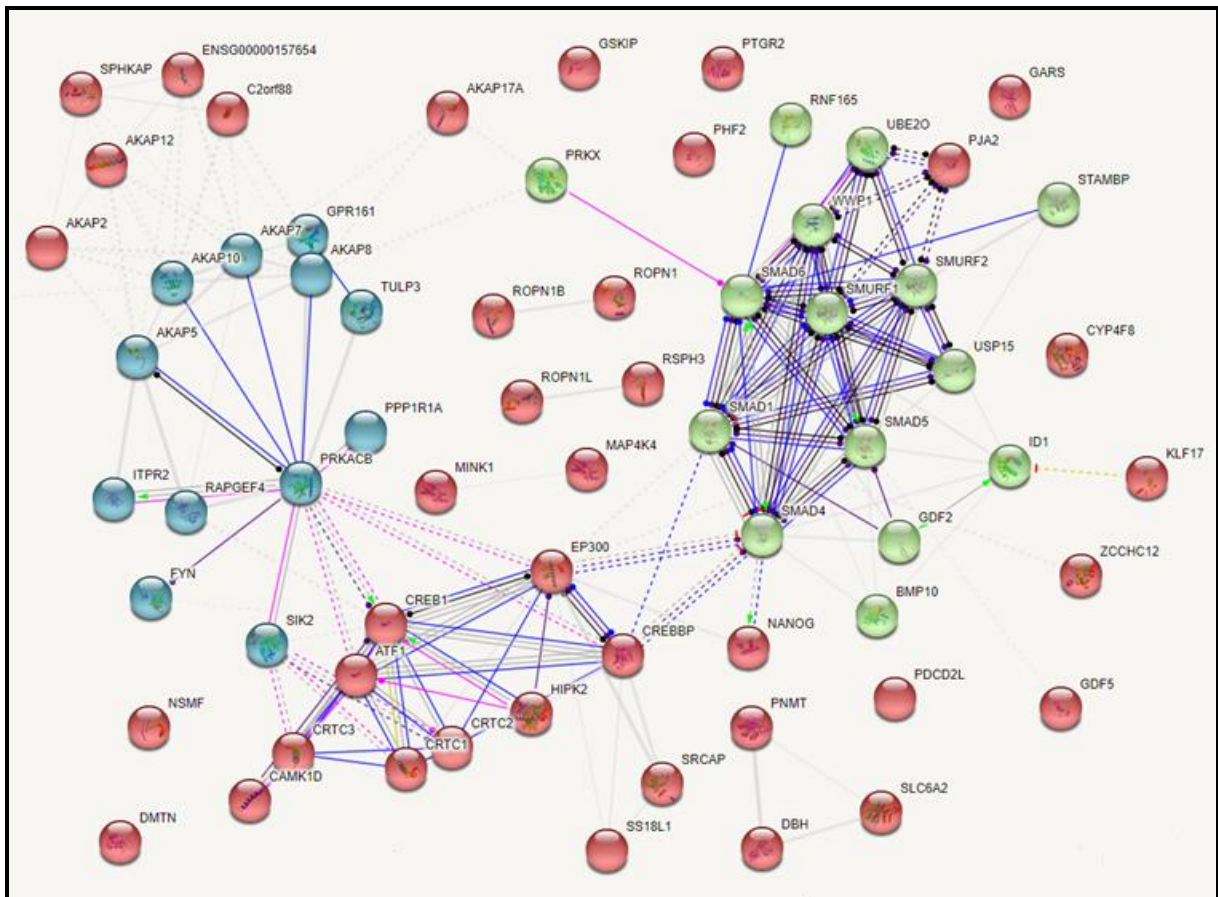
L'étude de ces voies de signalisations peut être complexe et impacter sur d'autres voies pouvant croiser avec celle que nous souhaitons moduler. Il existe pour cela aujourd'hui des outils informatiques permettant de simuler et de se projeter dans différentes voies de signalisations avant de se plonger dans les expériences manuelles.

En effet les criblages peuvent à présent s'informatiser entièrement. Des entreprises comme Prestwick ou encore MedChemExpress propose aujourd'hui des méthodes de criblages virtuels permettant d'identifier des leads potentiels en s'abstenant du développement d'un modèle cellulaire ou enzymatique. Ainsi ces essais se basent soit sur un crible virtuel basé sur la structure des molécules (SBVS), soit sur un crible virtuel basé sur les ligands (LBVS) principalement quand la structure 3D de la molécule n'est pas connue. En effet, le SBVS utilise le traitement des informations structurelles 3D de la protéine étudiée, en regroupant les données informatiques et expérimentales publiées afin de trouver un candidat pouvant se lier au site ciblé. Les données sont ensuite classées selon l'affinité de liaison prédictive à la molécule d'intérêt. Ceci est notamment utilisé pour les interactions protéines-protéines (pour trouver un inhibiteur par exemple) mais peut être extrapolé pour trouver un ligand dans un site de liaison spécifique d'un récepteur. Le LBVS quant à lui se base sur des molécules dont la structure 3D n'est pas nécessairement connue mais dont les fonctions biologiques sont identifiées, permettant de trouver de potentiels partenaires moléculaires (comme des similarités de fonctions et sous-structure).

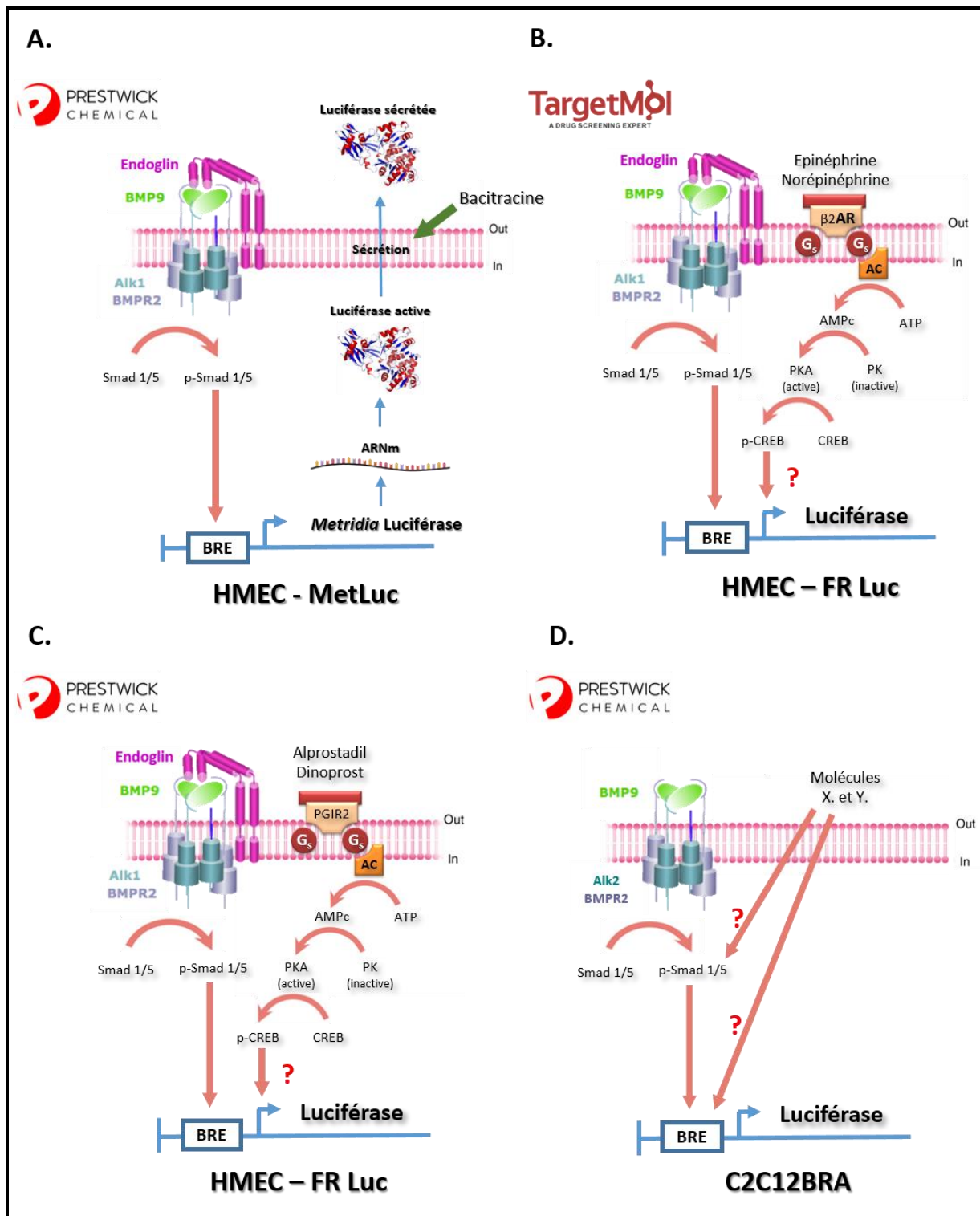
Une fois le crible effectué, les data sont récupérées pour analyser les candidats potentiels et peuvent être essayées sur les modèles représentatifs (comme des cellules endothéliales de patients par exemple dans notre cas) afin d'affiner les recherches quant aux voies de signalisations employées. Ceci peut représenter un gain de temps précieux et une économie considérable.

Avant même d'analyser les voies de signalisations intracellulaires impliquées *in vivo*, d'autres outils informatiques peuvent renseigner sur les partenaires cellulaires et les différentes voies modulées par les candidats identifiés. Ainsi on peut utiliser des outils comme HitPickV2, qui permettent d'afficher tous les partenaires moléculaires d'un candidat identifié.

Pour chaque molécule d'intérêt reinsérée dans le logiciel (par exemple l'alprostadil) celui-ci donne les cibles connues, classées selon la probabilité et la force d'interaction et d'affinité (dans le cas de l'alprostadil, on constate principalement des récepteurs de prostaglandines comme PTGER1, PTGER2, PTGIR, etc...). Une fois ces partenaires connus, il est possible d'utiliser STRING tool, un logiciel regroupant les voies de signalisations entre elles. Ainsi, je peux renseigner tous les acteurs moléculaires de différentes voies (par ex. : les molécules impliquées dans la voie BMP9 et les molécules impliquées dans la voie de l'alprostadil) et le logiciel identifie les croisements signalétiques possibles en analysant les banques de données publiées (Figure 46). Nous avons pu identifier des liens entre Smad4 et CREBBP-EP300, et Smad1-CREBBP et la littérature associée (J.N Topper *et al.*, 1998), pouvant donner une nouvelle piste d'étude pour comprendre la voie de signalisation BMP9 et trouver de nouvelles molécules pouvant moduler celle-ci. Ceci constitue un outil considérable dans les caractérisations de ces voies, afin de discriminer de manière plus rapide et précise quels sont les acteurs intracellulaires susceptibles d'influer sur la réponse luciférase observée lors du crible, pour enfin poursuivre avec les analyses *in vivo* dans les modèles cellulaires ou animaux afin de confirmer les modélisations virtuelles.



**Figure 46 :** Schéma STRING issu de StringTool. Liens STRING simulés entre les différents acteurs moléculaires de la voie BMP9 (GDF2) et BMP10 (en vert), de la voie des prostaglandines (en turquoise) et de la voie AMPc (en rouge). Simulation effectuée sur la version 11 du freeware de string-db.org.



**Figure 47 : Figure récapitulative des différents criblages effectués.** (A.) : Schéma présentant la bacitracine comme top hit du criblage de Prestwick sur HMEC – MetLuc. La Bacitracine semble agir directement sur la sécrétion de la luciférase, montrant que le modèle HMEC-MetLuc pouvait générer de faux positifs. (B.) : Schéma présentant l'épinéphrine et la norépinéphrine comme top hits du criblage TargetMol sur le modèle HMEC-FR Luc. Ces molécules semblent ici utiliser principalement les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques pour activer le BRE par la voie de l'AMPc. (C.) : Schéma présentant l'alprostadil et le dinoprost comme top hits du criblage Prestwick sur le modèle HMEC-FR Luc. Ces molécules semblent ici utiliser principalement les récepteurs aux prostaglandines PGIR2 pour activer le BRE par la voie de l'AMPc. (D.) : Schéma présentant les molécules X. et Y. comme top hits du criblage manuel effectué sur les 39 molécules sorties positives du criblage primaire en C., et sur le modèle C2C12BRA. Le mécanisme d'action des molécules est actuellement en cours d'investigation.

## Annexes

- Article « Selective BMP-9 Inhibition Partially Protects Against Experimental Pulmonary Hypertension » publié en Mars 2019 auquel j'ai contribué (doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313356).
- Revue « Present and future treatments for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia » soumise à publication à Orphanet Journal of Rare Diseases, dont je suis premier auteur.

## Selective BMP-9 Inhibition Partially Protects Against Experimental Pulmonary Hypertension

Ly Tu, Agnès Desroches-Castan, Christine Mallet, Laurent Guyon, Amélie Cumont, Carole Phan, Florian Robert, Raphaël Thuillet, Jennifer Bordenave, Ayumi Sekine, Alice Huertas, Olli Ritvos, Laurent Savale, Jean-Jacques Feige, Marc Humbert, Sabine Bailly,\* Christophe Guignabert\*

**Rationale:** Although many familial cases of pulmonary arterial hypertension exhibit an autosomal dominant mode of inheritance with the majority having mutations in essential constituents of the BMP (bone morphogenetic protein) signaling, the specific contribution of the long-term loss of signal transduction triggered by the BMPR2 (type 2 BMP receptor) remains poorly characterized.

**Objective:** To investigate the role of BMP9, the main ligand of ALK1 (Activin receptor-like kinase 1)/BMPR2 heterocomplexes, in pulmonary hypertension.

**Method and Results:** The absence of BMP9 in *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice and its inhibition in C57BL/6 mice using neutralizing anti-BMP9 antibodies substantially prevent against chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension judged by right ventricular systolic pressure measurement, right ventricular hypertrophy, and pulmonary distal arterial muscularization. In agreement with these observations, we found that the BMP9/BMP10 ligand trap ALK1<sub>ECD</sub> administered in monocrotaline or Sugen/hypoxia (SuHx) rats substantially attenuate proliferation of pulmonary vascular cells, inflammatory cell infiltration, and regresses established pulmonary hypertension in rats. Our data obtained in human pulmonary endothelial cells derived from controls and pulmonary arterial hypertension patients indicate that BMP9 can affect the balance between endothelin-1, apelin, and adrenomedullin. We reproduced these in vitro observations in mice chronically exposed to hypoxia, with *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice exhibiting lower mRNA levels of the vasoconstrictor peptide ET-1 (endothelin-1) and higher levels of the 2 potent vasodilator factors apelin and ADM (adrenomedullin) compared with *Bmp9*<sup>+/+</sup> littermates.

**Conclusions:** Taken together, our data indicate that the loss of BMP9, by deletion or inhibition, has beneficial effects against pulmonary hypertension onset and progression. (*Circ Res.* 2019;124:846-855. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313356.)

**Key Words:** animal model ■ endothelial cells ■ growth differentiation factor 2 ■ pulmonary artery ■ vascular remodeling

Pulmonary endothelial dysfunction associated to pulmonary arterial hypertension (PAH) is a key pathogenetic mechanism that could be detrimental for disease susceptibility and development of pulmonary vascular remodeling.<sup>1-3</sup> Despite recent progress in the treatment of PAH,<sup>4</sup> most patients still die from the disease or fail to respond adequately to medical therapy with a 5-year survival of 59%.<sup>5</sup> Current treatments can relieve some PAH symptoms and slow the progress of the disease in some patients, but they have a limited impact on the progressive pulmonary vascular remodeling that eventually culminates in right heart failure. Since 2000, heterozygous germline

mutations in the *Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2* (*BMPR2*) gene have been identified as critical genetic factors predisposing to pulmonary vascular remodeling and PAH development with low penetrance.<sup>6-8</sup> Still, the specific contribution of the long-term loss of signal transduction triggered by this signaling pathway remains poorly characterized.

**Editorial, see p 822**  
**Meet the First Author, see p 818**

Among BMPs, BMP9 and BMP10 are 2 high-affinity ligands for ALK1 (Activin receptor-like kinase 1) and BMPR2

Original received May 14, 2018; revision received January 7, 2019; accepted January 11, 2019. In December 2018, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 14.99 days.

From the INSERM UMR\_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France (L.T., A.C., C.P., R.T., J.B., A.S., A.H., L.S., M.H., C.G.); Faculté de Médecine, Université Paris-Sud and Université Paris-Saclay, Kremlin-Bicêtre, France (L.T., A.C., C.P., R.T., J.B., A.S., A.H., L.S., M.H., C.G.); Université Grenoble Alpes, Inserm, CEA, BIG-Biologie du Cancer et de l'Infection, Grenoble, France (A.D.-C., C.M., L.G., F.R., J.-J.F., S.B.); AP-HP, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, DHU Thorax Innovation, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France (A.S., A.H., L.S., M.H.); and Department of Bacteriology and Immunology and Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland (O.R.).

\*S.B. and C.G. contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCRESAHA.118.313356>.

Correspondence to Christophe Guignabert, PhD, INSERM UMR\_S 999, 133, Ave de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France, email christophe.guignabert@inserm.fr; or Sabine Bailly, PhD, Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection, CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France, email sabine.bailly@cea.fr

© 2019 American Heart Association, Inc.

*Circulation Research* is available at <https://www.ahajournals.org/journal/res>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313356



## Novelty and Significance

### What Is Known?

- Autosomal dominant mutations in the *BMPR2* (type 2 BMP receptor), *ACVLR1* (*ALK1*), *GDF2* (*BMP9*), and in the *BMP10* genes predispose to heritable pulmonary arterial hypertension.
- BMP9 and BMP10 are 2 high affinity ligands for ALK1 (activin receptor-like kinase 1) and BMPRII present in a heterotetrameric complex on pulmonary endothelial cells.
- Perturbation in the BMP9/BMP10 signaling pathway have emerged as essential in endothelial (dys)function and vascular remodeling.

### What New Information Does This Article Contribute?

- Using 3 different approaches of suppressing BMP9 action in rodents, we provide evidence that the selective loss or inhibition of BMP9 does not predispose, but partially prevent or protect against experimental pulmonary hypertension.

- We show that BMP9 regulates the endothelial synthesis/release of potent vasoreactive factors in vitro and in vivo, namely endothelin-1, apelin, and adrenomedullin.

These findings offer new insight into the complexity of endothelial BMP9 signaling and may have important implications for human pulmonary arterial hypertension. Our data support the notion that blockade of BMP9 signaling can protect the pulmonary endothelium and attenuate the structural and functional remodeling of the lung vasculature. Further studies are needed to better understand the differences between experimental models and the human predisposition to pulmonary arterial hypertension identified in subjects carrying *BMP9* germline mutations. The apparent ambivalent role of the BMP9/BMP10 signaling pathway should stimulate work to better understand this feature and the underlying mechanisms.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

ADM	adrenomedullin
ALK1	activin receptor-like kinase 1
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type 2
EC	endothelial cell
ET-1	endothelin-1
MCT	monocrotaline
mPAP	mean pulmonary arterial pressure
PA	pulmonary arteries
PAH	pulmonary arterial hypertension
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RV	right ventricle
ROCK	Rho/Rho-associated protein kinase
SuHx	sugen/hypoxia
TPVR	total pulmonary vascular resistance

present in a heterotetrameric complex on pulmonary endothelial cells (ECs),<sup>9</sup> and thereby are key actors of vascular development and homeostasis.<sup>10</sup> Perturbation in the BMP9/BMP10 signaling pathway has emerged as essential in endothelial (dys)function and vascular remodeling, in particular in PAH, and hereditary hemorrhagic telangiectasia.<sup>11,12</sup> In line with this notion, several works have highlighted a potential role for this pathway in the regulation of vascular tone<sup>13</sup> and in the modulation of ET-1 (endothelin-1)<sup>14,15</sup> and apelin, 2 potent vasoreactive mediators for the pulmonary vasculature.<sup>16,17</sup> Even if *Bmp9*-KO mice are viable and present no obvious defects, these mice exhibit an altered lymphatic maturation that leads to drainage deficiency.<sup>18</sup> Although new biomedical therapeutics targeting BMPs or the BMP signaling pathway hold promise in future treatment strategies for PAH and other life-threatening diseases, our current understanding of the molecular signaling pathways activated by BMPs and their exact pathogenic roles remains limited.<sup>11</sup>

Therefore, we hypothesized that long-term loss of endothelial BMP9 signaling in rodents could alter pulmonary vascular tone and remodeling, thereby reducing their susceptibility to pulmonary hypertension.

## Methods

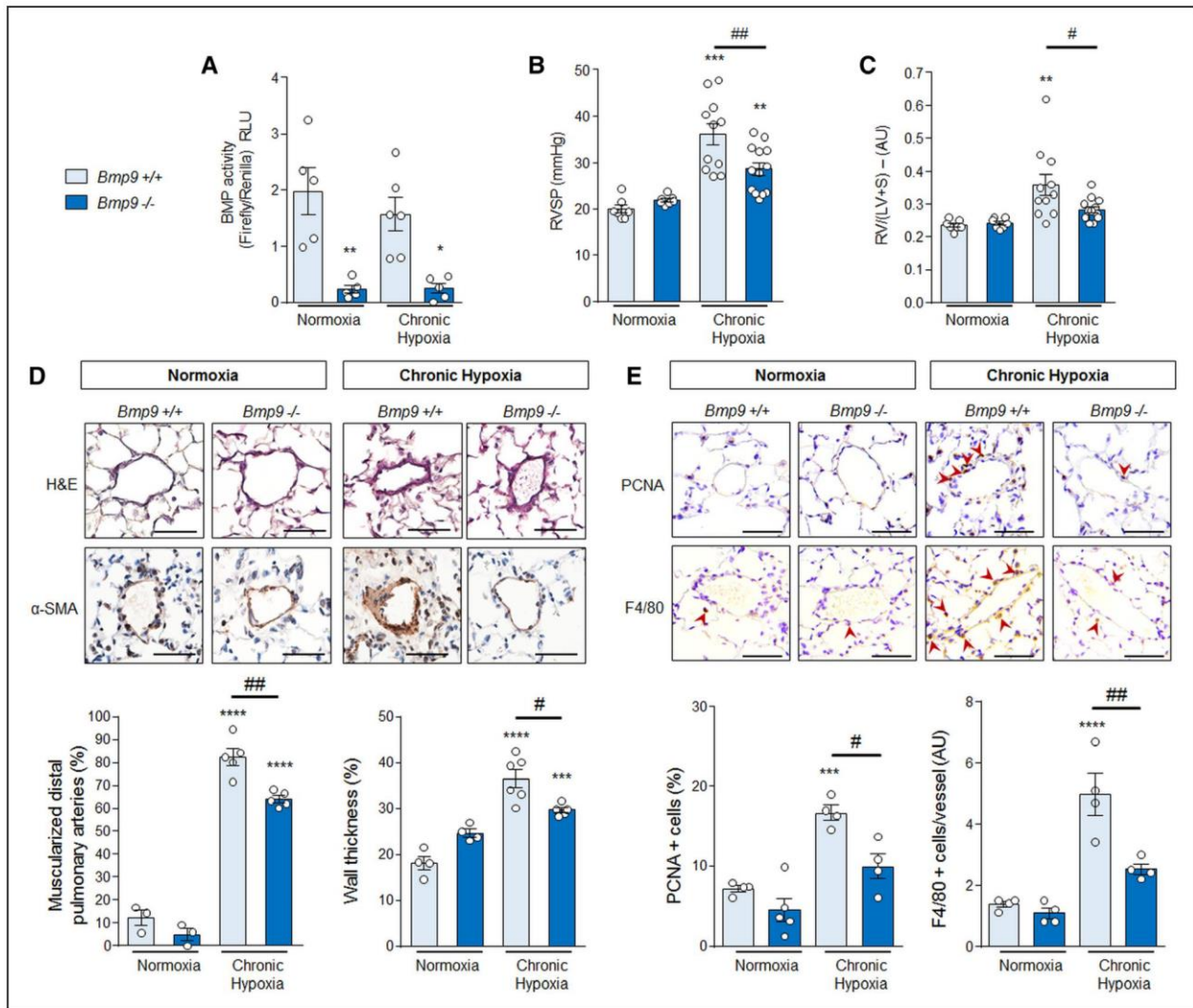
The authors declare that all supporting data are available within the article and its [Online Data Supplement](#).

Because of space limitations, a detailed description of the Materials and Methods is presented in the [Online Data Supplement](#).

## Results

### Mice Deficient in BMP9 (*Bmp9*<sup>-/-</sup>) are Less Susceptible to Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension

To gain information about the role of BMP9 in the susceptibility of mice to develop pulmonary hypertension (PH), we used mice congenitally deficient in the expression of the BMP9 gene (*Gdf2*). The loss of active circulating BMP9 levels in *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice was confirmed using a BMP responsive luciferase reporter assay (Figure 1A). Consistent with these findings, a 2-fold decrease in phosphorylated (p)-Smad1/5/8 and p-P38 were found in lungs of *Bmp9*<sup>-/-</sup> versus *Bmp9*<sup>+/+</sup> littermates and no compensatory upregulation of other BMP family members was present in these mice deficient in BMP9 (Online Figure 1). *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice in the C57BL/6 background are viable and present no obvious defects except a defect in lymphatic maturation.<sup>17,18</sup> Our present findings indicate that *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice are less susceptible to pulmonary vascular remodeling than *Bmp9*<sup>+/+</sup> littermates when exposed to chronic hypoxia. Indeed, the elevations in right ventricular systolic pressure (Figure 1B) and right ventricular hypertrophy (right ventricle (RV)/left ventricle+septum weight ratio) (Figure 1C) following chronic hypoxia were lower in the *Bmp9*<sup>-/-</sup> than the *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice. No significant differences were observed in heart rate or systemic pressures between *Bmp9*<sup>-/-</sup> and *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (heart rate: 320±34 versus 324±44 bpm, respectively, NS; systemic blood pressure: 110±20 versus 105±18, n=10, respectively, NS). Similar findings have also been observed with intravenous administration of the active monocrotaline metabolite (monocrotaline pyrrole) to *Bmp9*<sup>-/-</sup> and *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (Online Figure II). Following chronic hypoxia, the less pronounced right ventricular systolic pressure elevation in the *Bmp9*<sup>-/-</sup> was also associated with a decreased number and thickness of muscularized



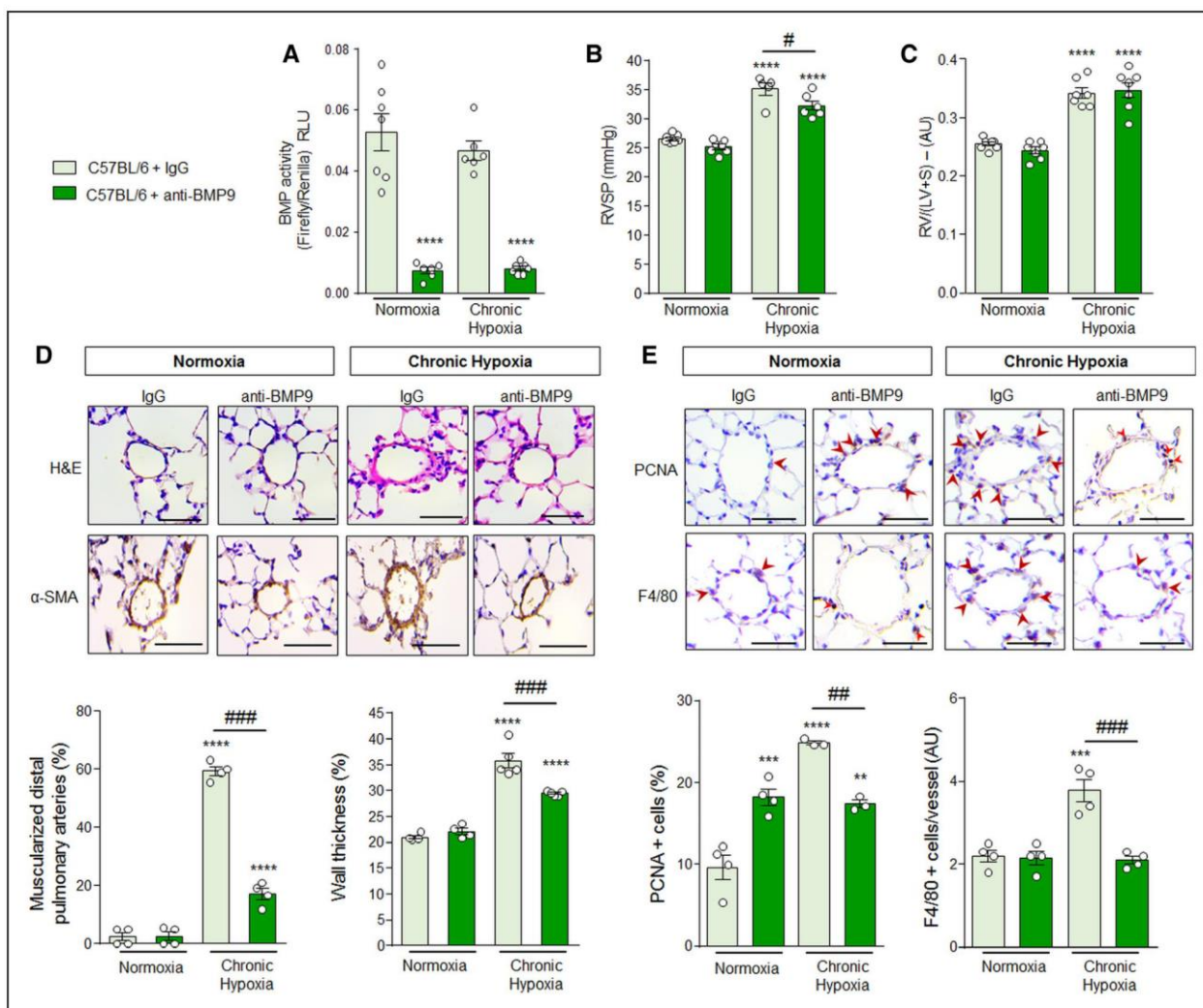
**Figure 1. Susceptibility of mice deficient in BMP9 (bone morphogenetic protein; *Bmp9*<sup>-/-</sup>) to the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (PH).** **A**, Analyses of the luciferase reporter activity under the control of the BMP response element (BRE)-containing promoter in the sera of *Bmp9*<sup>+/+</sup> and *Bmp9*<sup>-/-</sup> knockout mice (*Bmp9*<sup>-/-</sup>; n=5–6). The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. **B**, Right ventricular systolic pressures (RVSP) and **(C)** right ventricular hypertrophy expressed by the Fulton index in *Bmp9*<sup>-/-</sup> and *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (n=7–13). **D**, Representative images of hematoxylin and eosin (H&E),  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) staining, and quantification of the percentage of muscularized distal pulmonary arteries (intraalveolar vessels <200  $\mu$ m) and of wall thickness in lungs from *Bmp9*<sup>-/-</sup> and *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (n=3–6). **E**, Representative images of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and F4/80 immunostaining, and quantification of the percentage of PCNA and F4/80 positive cells (arrow heads) per vessels in lungs from *Bmp9*<sup>-/-</sup> and *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice. Scale bars: 50  $\mu$ m. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=4–5). Comparisons were made using 1-way ANOVA with Tukey post hoc tests. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001 vs *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice under normoxia; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, vs *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice under chronic hypoxia. AU indicates arbitrary unit; LV, left ventricle; RV, right ventricle; and S, septum.

distal pulmonary arteries versus *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (Figure 1D). Consistent with these observations, we did not observe a significant increase in the number of PCNA<sup>+</sup> (proliferating cell nuclear antigen positive) cells or an accumulation of F4/80<sup>+</sup> cells (monocytes/macrophages) in the perivascular area of muscularized vessels in *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice under normoxic versus hypoxic conditions in contrast to *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice (Figure 1E).

### Administration of Neutralizing Anti-BMP9 Antibodies in Mice Prevents Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension

To further demonstrate the role of BMP9 in the susceptibility of mice to develop PH, we study the effect of suppressing BMP9 action in adult C57BL/6 mice (wild type) with

neutralizing anti-BMP9 antibodies (kindly obtained from Dr M. Yan). Weekly administration of neutralizing anti-BMP9 antibodies (5 mg/kg, IP) after hypoxia exposure completely inhibited BMP circulating ALK1-dependent activity (Figure 2A). Consistent with our hypothesis and our findings obtained in *Bmp9* deficient mice, we found that C57BL/6 mice chronically exposed to hypoxia and treated with neutralizing anti-BMP9 antibodies were less susceptible to the development of chronic hypoxia-induced PH than C57BL/6 mice treated with IgG. The severity of the disease was assessed by right ventricular systolic pressure measurement (Figure 2B), by right ventricular hypertrophy (Figure 2C), and by pulmonary distal arterial muscularization (Figure 2D). We also noted



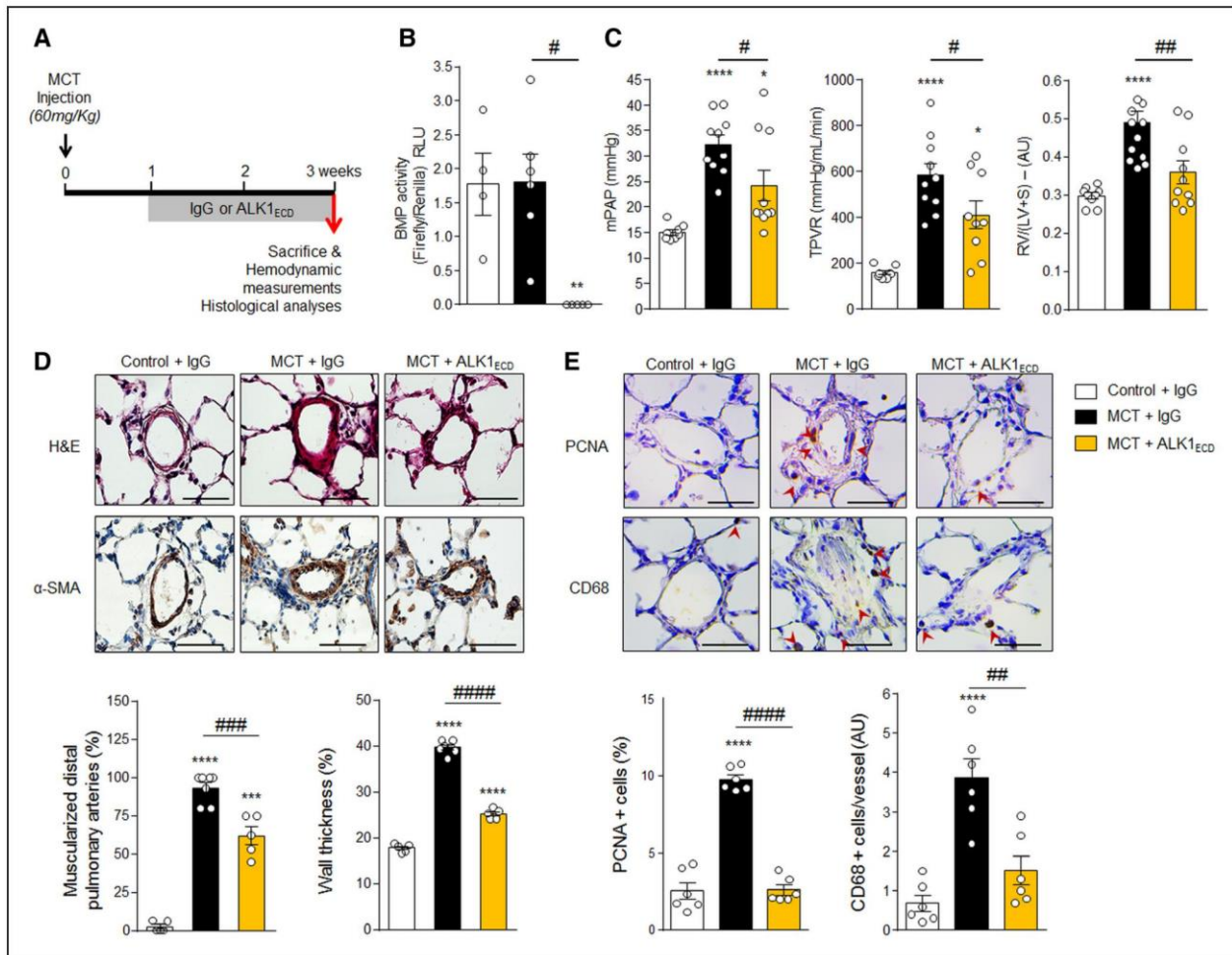
**Figure 2.** Efficacy of chronic treatment with the neutralizing anti-BMP9 (bone morphogenetic protein 9) antibodies in the mouse model of hypoxia-induced pulmonary hypertension. **A**, Analyses of the luciferase reporter activity under the control of the BMP response element (BRE)-containing promoter in the sera of C57BL/6 mice treated with either the neutralizing anti-BMP9 or IgG antibodies (n=6–7). The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. **B**, Right ventricular systolic pressures (RVSP) and **(C)** right ventricular hypertrophy expressed by the Fulton index in C57BL/6 mice treated with either the neutralizing anti-BMP9 or IgG antibodies (n=5–7). **D**, Representative images of hematoxylin and eosin (H&E),  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) staining and quantification of the percentage of muscularized distal pulmonary arteries (intraalveolar vessels <200  $\mu$ m) and of wall thickness in lungs from C57BL/6 mice treated with either the neutralizing anti-BMP9 or IgG antibodies (n=4–5). **E**, Representative images of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and F4/80 immunostaining, and quantification of the percentage of PCNA and F4/80 positive cells (arrow heads) per vessels in lungs from C57BL/6 mice treated with either the neutralizing anti-BMP9 or IgG antibodies. Scale bars: 50  $\mu$ m. Data are presented as mean $\pm$ SEM (3–5). Comparisons were made using 1-way ANOVA with Tukey post hoc tests. \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, \*\*\*\* $P$ <0.0001 vs C57BL/6 mice treated with IgG antibodies under normoxia; # $P$ <0.05, ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 vs C57BL/6 mice treated with IgG antibodies under chronic hypoxia. AU indicates arbitrary unit; LV, left ventricle; RV, right ventricle; and S, septum.

that cell proliferation and the degree of inflammatory cell infiltration were significantly decreased in lungs from C57BL/6 mice chronically exposed to hypoxia and treated with neutralizing anti-BMP9 antibodies when compared with lungs of C57BL/6 mice chronically exposed to hypoxia and treated with IgG (Figure 2E).

### Efficacy of Treatment With the Soluble Extracellular ALK1 Domain (ALK1<sub>ECD</sub>) on the Progression of Established PH in 2 Complementary and Well-Established Models of Severe PH in Rats

Next, these results prompted us to test the efficacy of the soluble extracellular ALK1 domain (ALK1<sub>ECD</sub>), a ligand trap targeting ALK1's ligands thus both BMP9 and BMP10,<sup>19</sup> on the

development of monocrotaline (MCT)-induced PH in Wistar rats. Treatment with ALK1<sub>ECD</sub> (4 mg/kg, IP) was started 1 week after a subcutaneous MCT injection and was repeated 1 week later (3 mg/kg, IP; Figure 3A). We first validated that the weekly ALK1<sub>ECD</sub> administration completely inhibited BMP circulating ALK1-dependent activity (Figure 3B). On day 21, in MCT-injected rats treated with human IgG, a marked increase in mean pulmonary arterial pressure, total pulmonary vascular resistance, RV/(left ventricle+septum) ratio (Figure 3C), percentage medial wall thickness, and numbers of muscularized distal pulmonary arteries (Figure 3D) were found compared with controls. However, MCT-injected rats receiving ALK1<sub>ECD</sub> exhibited reduced mean pulmonary

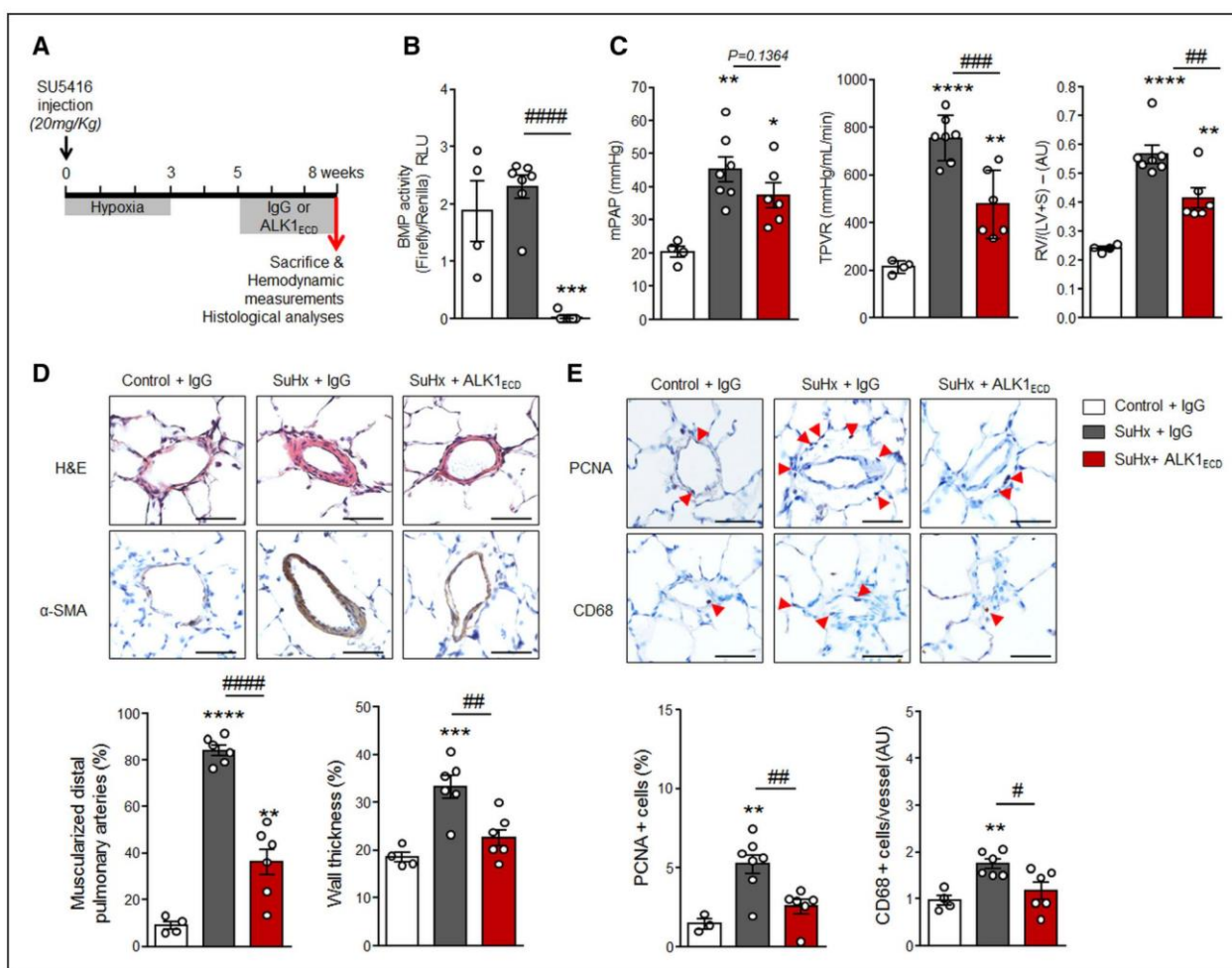


**Figure 3.** Efficacy of chronic treatment with the BMP9/BMP10 (bone morphogenetic protein) ligand trap targeting ALK1's ligands in the rat model of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **A**, Experimental design. **B**, Analyses of the luciferase reporter activity under the control of the BMP response element (BRE)-containing promoter in the sera of control+IgG and monocrotaline (MCT)-injected rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=4–6). The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. **C**, Mean pulmonary arterial pressures (mPAP), total pulmonary vascular resistance (TPVR), and right ventricular hypertrophy expressed by the Fulton index in control+IgG and MCT-injected rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=8–11). **D**, Representative images of hematoxylin and eosin (H&E),  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) staining, and quantification of the percentage of muscularized distal pulmonary arteries (intraalveolar vessels <200  $\mu$ m) and of wall thickness in lungs from control+IgG and MCT-injected rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=5–7). **E**, Representative images of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and CD68 immunostainings, and quantification of the percentage of PCNA and CD68 positive cells (arrow heads) per vessel in lungs from control+IgG and MCT-injected rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG. Scale bars: 50  $\mu$ m. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=6). Comparisons were made using 1-way ANOVA with Tukey post hoc tests. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001 vs control rats treated with IgG antibodies; #*P*<0.05, ###*P*<0.001, ####*P*<0.0001 vs MCT rats treated with IgG antibodies. ALK1 indicates activin receptor-like kinase 1; AU, arbitrary unit; ECD, extracellular domain; LV, left ventricle; RV, right ventricle; and S, septum.

arterial pressure, total pulmonary vascular resistance, and RV/(left ventricle+septum) ratio as compared with MCT-injected rats receiving IgG (Figure 3C). Consistent with these results, the percentages of medial wall thickness and of muscularized distal pulmonary arteries were substantially decreased in MCT-injected rats receiving ALK1<sub>ECD</sub> when compared with MCT-injected rats receiving IgG (Figure 3D). In addition, we found a substantial decrease in collagen deposition in the RV myocardium of MCT-injected rats receiving ALK1<sub>ECD</sub> when compared with MCT-injected rats receiving IgG, an observation that is consistent with the more preserved cardiac function observed in this ALK1<sub>ECD</sub>-treated rats (Online Figure IIIA-B). Interestingly, no significant differences were found in the number of PCNA+ and CD68+ (monocyte/macrophages) cells in pulmonary vessel walls in lungs of MCT-injected rats

receiving ALK1<sub>ECD</sub> as compared to lungs of control rats receiving IgG (Figure 3E).

To validate our findings obtained in the MCT rat model, weekly treatments of Sugden-hypoxia (SuHx) rats with ALK1<sub>ECD</sub> or IgG were next performed (Figure 4). Treatment with ALK1<sub>ECD</sub> (4 mg/kg, IP) was started 5 weeks post-SU5416 injection and was repeated 1 and 2 weeks later (3 mg/kg, IP; Figure 4A). We first validated that the weekly ALK1<sub>ECD</sub> administration completely inhibited BMP circulating ALK1-dependent activity (Figure 4B). Eight weeks post-SU5416 injection, SuHx rats develop severe experimental PH, as reflected by a marked increase in values of mean pulmonary arterial pressure total pulmonary vascular resistance, and Fulton index (Figure 4C). Although only a trend towards lower mean pulmonary arterial pressure values was found,



**Figure 4.** Efficacy of chronic treatment with the BMP9/BMP10 (bone morphogenetic protein 9/10) ligand trap ALK1<sub>ECD</sub> in the Sugeng-hypoxia (SuHx) rat model of severe pulmonary hypertension. **A**, Experimental design. **B**, Analyses of the luciferase reporter activity under the control of the BMP response element (BRE)-containing promoter in the sera of Control+immunoglobulin G (IgG) and SuHx rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=4–7). The relative firefly luciferase activity was normalized to renilla luciferase activity. **C**, Mean pulmonary arterial pressures (mPAP), total pulmonary vascular resistance (TPVR), and right ventricular hypertrophy expressed by the Fulton index in control+IgG and SuHx rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=4–7). **D**, Representative images of hematoxylin and eosin (H&E), α-SMA (alpha-smooth muscle actin) staining, and quantification of the percentage of muscularized distal pulmonary arteries (intraalveolar vessels <200 μm) and of wall thickness in lungs from Control+IgG and SuHx rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=4–6). **E**, Representative images of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and CD68 immunostainings, and quantification of the percentage of PCNA and CD68 positive cells (arrow heads) per vessel in lungs from Control+IgG and SuHx rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=3–7). Scale bars: 50 μm. Data are presented as mean±SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA with Tukey post hoc tests. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 vs Control rats treated with IgG antibodies; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001, ####P<0.0001 vs MCT rats treated with IgG antibodies. ALK1, activin receptor-like kinase 1; AU, arbitrary unit; ECD, extracellular domain; LV, left ventricle; RV, right ventricle; and S, septum.

SuHx rats treated with ALK1<sub>ECD</sub> exhibit less severe PH when compared with SuHx rat-treated with IgG, as reflected by significantly lower values of total pulmonary vascular resistance and Fulton index (Figure 4C). Consistent with these findings and those obtained in the MCT rat model, we also noted a beneficial effect of ALK1<sub>ECD</sub> treatments on the pulmonary arterial muscularization (Figure 4D), numbers of PCNA+ and CD68+ cells per vessel (Figure 4E), as well as on RV function and collagen deposition in the RV myocardium (Online Figure IIIC-D) when compared with SuHx rat-treated with IgG.

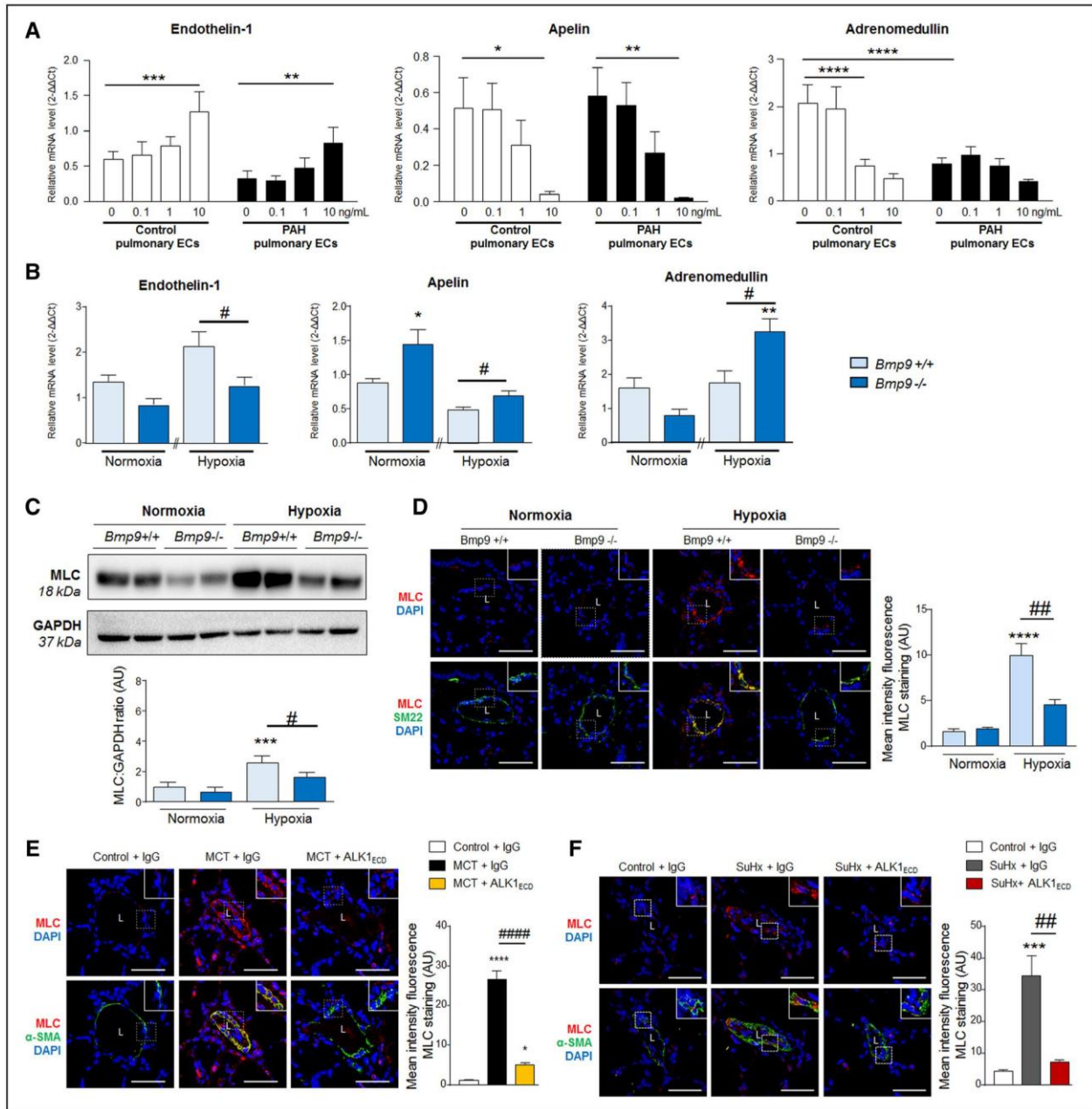
### BMP9 Regulates In Vitro and In Vivo the Balance of Key Vascular Tone Regulators

BMP9 has been described as a potential vasoconstriction factor in the chick chorioallantoic membrane assay<sup>13</sup> and as a BMP

ligand that can down-regulate the expression of the vasodilator factor apelin<sup>16,17</sup> and increase the vasoconstrictor peptide ET-1.<sup>14,15</sup> An in silico reanalysis of the microarray data (accession number E-MTAB-2495) obtained from Long et al<sup>20</sup> in which, human pulmonary ECs were stimulated with 1 ng/mL of recombinant BMP9 for 4 hours, revealed 2 key pathways that are susceptible to regulate vascular contraction, namely the cGMP-PKG signaling pathway” and the “Vascular smooth muscle contraction pathway. Based on these sets of genes and their known effectors, we set-up a list of genes that allowed us to identify 23 genes that were significantly regulated by BMP9 (Online Figure IV), including apelin and ADM (adrenomedullin), 2 potent vasodilator factors. We thus investigated whether recombinant human BMP9 could alter the balance between pulmonary endothelium-derived relaxing factors and contracting factors in

in vitro using freshly isolated pulmonary ECs established from lung tissue obtained from control and PAH patients (both idiopathic and *BMPR2* mutation carriers). Interestingly, we found that recombinant human BMP9 induced a dose-dependent production of ET-1, and a dose-dependent decrease in the production of apelin and ADM in control pulmonary ECs (Figure 5A). A similar profile was observed in pulmonary ECs derived from

PAH patients except for ADM level that was already significantly reduced at the basal level in comparison to control cells (Figure 5A). Based on these in vitro findings, we then assessed the levels of the synthesis of potent vasoactive factors in lungs of *Bmp9<sup>-/-</sup>* and *Bmp9<sup>+/+</sup>* mice under normoxic and hypoxic conditions. Consistent with our findings showing that *Bmp9<sup>-/-</sup>* mice are less susceptible to chronic hypoxia-induced



**Figure 5. Effects of BMP9 (bone morphogenetic protein 9) on the expression of endothelin-1 (ET-1), apelin, and adrenomedullin (ADM).** Gene expression analysis of ET-1, apelin and ADM (A) in freshly isolated pulmonary endothelial cells derived from lung tissue obtained from control (n=5) and pulmonary arterial hypertension (PAH) patients (n=7) exposed to increasing doses of recombinant human (rh) BMP9 and (B) in lungs of *Bmp9<sup>-/-</sup>* and *Bmp9<sup>+/+</sup>* mice under normoxic and hypoxic conditions (n=7–11). C, Representative Western blots and quantification of the myosin light chain (MLC)/GAPDH ratio in lungs of *Bmp9<sup>-/-</sup>* and *Bmp9<sup>+/+</sup>* mice under normoxic and hypoxic conditions (n=5–11). D–F, Confocal immunofluorescence analyses of MLC, SM22 or α-SMA (alpha-smooth muscle actin), and 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) in lungs from (D) *Bmp9<sup>-/-</sup>* and *Bmp9<sup>+/+</sup>* mice under normoxic and hypoxic conditions (n=5) and from (E) MCT (monocrotaline) injected rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=5) and from (F) SuHx rats receiving either ALK1<sub>ECD</sub> or IgG (n=4). Scale bars: 50 μm. Data are presented as mean±SEM. Comparisons were made using 1-way ANOVA with Tukey post hoc tests. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001, \*\*\*\**P*<0.0001 vs cells exposed to 0 ng/mL of rhBMP9 or *Bmp9<sup>+/+</sup>* mice under normoxia; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.0001 vs *Bmp9<sup>-/-</sup>* mice under chronic hypoxia. ALK1 indicator activin receptor-like kinase 1; AU, arbitrary unit; ECD, extracellular domain; and L, lumen.

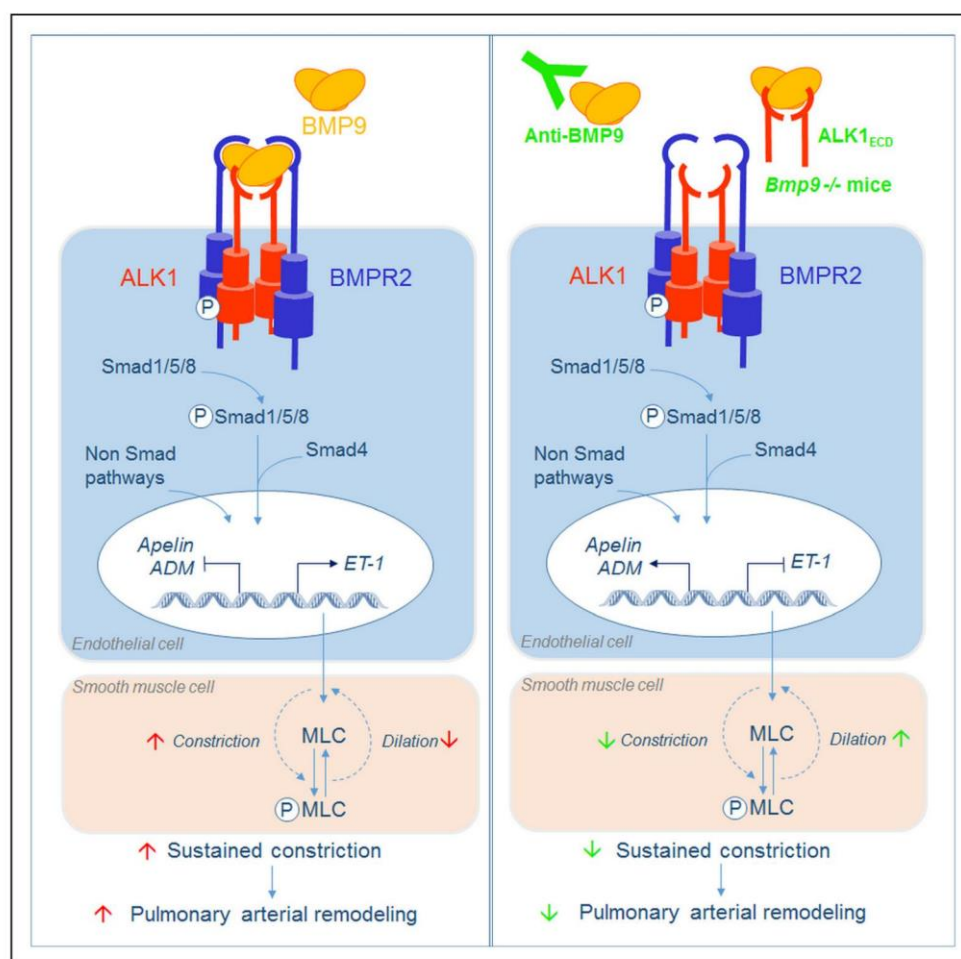
PH, we found a decreased ET-1 mRNA level and an increased apelin and ADM mRNA levels in *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice chronically exposed to hypoxia compared with *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice chronically exposed to hypoxia (Figure 5B). Since these mediators can regulate the function and the thickness of the underlying smooth muscle cells and because myosin light chain is a major regulatory molecule for smooth muscle contraction, we next studied its expression in lungs of *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice under normoxic and hypoxic conditions. Interestingly, we found that myosin light chain protein expression is decreased in lungs of *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice chronically exposed to hypoxia compared with *Bmp9*<sup>+/+</sup> mice chronically exposed to hypoxia (Figure 5C and 5D), a phenomenon that was associated with decreased activity of the ROCK (Rho/Rho-associated protein kinase) signaling pathway (Online Figure V). Consistent with these findings obtained in lungs of *Bmp9*<sup>-/-</sup> mice, a substantial decrease in myosin light chain protein expression was found in lungs of MCT- and SuHx rats receiving ALK1<sub>ECD</sub> when compared with lungs of MCT- and SuHx rats receiving IgG (Figure 5E and 5F).

### Discussion

Our study identifies BMP9, also known as GDF2 (growth and differentiation factor 2), as a major factor for controlling functions of pulmonary vascular cells (Figure 6). Using 3 different

approaches of suppressing BMP9 action in rodents (*Bmp9*<sup>-/-</sup> mice, administration of neutralizing anti-BMP9 antibodies or of ALK1<sub>ECD</sub> ligand trap for BMP9 and BMP10 in rats) in different complementary and well-established animal models of PH, we demonstrate that the selective loss of BMP9 partially protects against experimental pulmonary hypertension.

These results seem at first glance counter-intuitive, as it would have been expected that less ligands for the BMP2 receptor should mimic the loss of BMP2 signaling found in PAH patients. In accordance with this hypothesis, it was recently proposed to enhance this pathway by exogenous BMP9 in PAH.<sup>20</sup> Even if there are some arguments that support this notion,<sup>21-24</sup> our functional data indicate the opposite and further illustrate that BMP signaling is complex and involves many ligands and many receptor combinations that could explain these unexpected results, especially in the context of PAH. Indeed, it has been found that *BMP2* mutations could alter BMP signaling in a BMP ligand- or receptor-specific manner.<sup>25-27</sup> During the writing of this article, it was published that BMP9 could be a sensitive biomarker that segregates portopulmonary hypertension from other forms of PAH.<sup>28</sup> Together, these results clearly support that BMP9 signaling pathway is involved in PAH development but also that the molecular mechanisms involved in PAH are complex.



**Figure 6. Schematic diagram summarizing our findings.** ADM indicates adrenomedullin; ALK1, activin receptor-like kinase 1; BMPR2, bone morphogenetic protein receptor type 2; ECD, extracellular domain; ET-1, endothelin-1; and MLC, myosin light-chain.

BMP9 is mainly produced by the liver and circulates in blood under a biologically active form and has been proposed to act as a vascular quiescence factor.<sup>13</sup> Several works also support a potential role for this pathway in the regulation of vascular tone. Indeed, it was shown by our group and others that BMP9 induces the expression of ET-1, a strong vasoconstrictor,<sup>14,15</sup> and decreases the expression of apelin, a potent vasodilator for the pulmonary vasculature.<sup>16,17</sup> We also previously showed that addition of BMP9 induced vasoconstriction in the chicken chorionallantoic membrane.<sup>13</sup> So, one hypothesis that could explain why the loss of BMP9 protects from PH development is that BMP9 could act as a potent modulator of vasoconstriction in the pulmonary circulation. This hypothesis is consistent with the dilation phenotype observed in *Alkl* ± or *Eng* ± mice<sup>29,30</sup> or *Alkl* mutants, *vbg*, in zebrafish.<sup>31</sup> This hypothesis is further supported by the fact that we found that *Bmp9*<sup>-/-</sup> pups presented a partial reopening of the ductus arteriosus just after birth that could be because of a defect in vasoconstriction.<sup>32</sup> Interestingly, patent ductus arteriosus is a serious congenital heart disease that can lead to irreversible pulmonary hypertension.<sup>33</sup> We confirm here the downregulation of apelin and show, for the first time, the downregulation of adrenomedullin by BMP9, 2 known critical actors that can impair pulmonary endothelial function.<sup>34,35</sup>

We also confirm here that BMP9 induces a dose-dependent ET-1 expression in human pulmonary ECs and regulate its lung production in rodents. However, although BMP9 and other BMPs have been shown to induce ET-1,<sup>14,15</sup> unexpectedly BMPR2 downregulation is also associated with an increase in ET-1 expression,<sup>15,36</sup> supporting the notion that BMP9 stimulated ET-1 production by pulmonary ECs is not sufficient alone to lead to PH development and strengthening the evidence for the importance of BMP receptor balance in the control of vascular tone.

The role of BMP9 has recently been studied in a bronchopulmonary dysplasia model induced by chronic exposure to hyperoxia in neonatal rats. Consistent with our present findings, BMP9 treatment has been found to improve aberrant alveolar development and reduced lung inflammation and fibrosis but did not improve aberrant vascularization (arterial medial wall thickness and muscularization) and right ventricular hypertrophy.<sup>37</sup> In line with this notion, BMP9 and BMP10 can synergize with TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) to induce the upregulation of endothelial selectins and adhesion molecules and the secretion of various key proinflammatory mediators,<sup>38,39</sup> and are, therefore, likely to contribute to the proinflammatory signature of the dysfunctional endothelium in PAH.<sup>40</sup>

In the present study, we provide definitive evidence that the selective BMP9 loss or inhibition partially prevent and protects against experimental pulmonary hypertension. In addition, this study offers important physiopathological insights into the role of BMP9 in the synthesis of potent vasoreactive factors by the pulmonary endothelium in vitro and in vivo, namely ET-1, apelin, and adrenomedullin and may have important implications for human PAH.

### Acknowledgments

We thank Dr M. Yan (Genentech Inc, San Francisco) for kindly providing anti-BMP9 and ALK1<sub>EC</sub> reagents. We also thank Professor

F. Soubrier and Dr M. Eyries (Laboratoire d'Oncogénétique et Angiogénétique Moléculaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France) for the genetic analysis of pulmonary arterial hypertension patients.

### Sources of Funding

This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the University of Grenoble, the University of Paris-Sud and the University Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, the CEA (Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Direction de la Recherche Fondamentale (DRF)/Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG)/Laboratoire Biologie du Cancer et de l'Infection (BCI)), the French National Agency for Research (ANR) grant no. ANR-17-CE14-0006 (Be9inPH), the Fondation de la Recherche Médicale (FRM) grant no. DEQ20150331712 (Equipe FRM 2015), and in part by the Département Hospitalo-Universitaire Thorax Innovation (TORINO), the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, the LabEx Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique (LERMIT; grant no ANR-10-LABX-0033), the French pulmonary arterial hypertension patient association (HTAP France) and the french Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire-FRSR-Fondation du Souffle (FdS), the Ligues Départementales contre le Cancer de la Loire et de la Savoie, the association Maladie de Rendu-Osler (AMRO-HHT France), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). C. Phan is supported by the FRSR-FdS and J. Bordenave is supported by the FRM.

### Disclosures

In the past 3 years, M. Humbert and L. Savale report grants, personal fees, and nonfinancial support from Actelion, Pfizer, Bayer, and GlaxoSmithKline, MSD, outside of the submitted work. The other authors report no conflicts.

### References

- Guignabert C, Dorfmueller P. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2017;38:571–584. doi: 10.1055/s-0037-1606214
- Guignabert C, Tu L, Girerd B, Ricard N, Huertas A, Montani D, Humbert M. New molecular targets of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: importance of endothelial communication. *Chest*. 2015;147:529–537. doi: 10.1378/chest.14-0862
- Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives [published online December 13, 2018]. *Eur Respir J*. doi: 10.1183/13993003.01887-2018
- Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015;46:903–975. doi: 10.1183/13993003.01032-2015
- Boucly A, Weatherald J, Savale L, et al. Risk assessment, prognosis and guideline implementation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2017;50:1700889. doi: 10.1183/13993003.00889-2017
- Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67:737–744. doi: 10.1086/303059
- Evans JD, Girerd B, Montani D, et al. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4:129–137. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00544-5
- Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC. Heterozygous germline mutations in



- BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2000;26:81–84. doi: 10.1038/79226
9. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 2007;109:1953–1961. doi: 10.1182/blood-2006-07-034124
  10. Goumans MJ, Zwijsen A, Ten Dijke P, Bailly S. Bone morphogenetic proteins in vascular homeostasis and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10:a031989. doi: 10.1101/cshperspect.a031989
  11. Guignabert C, Bailly S, Humbert M. Restoring BMPRII functions in pulmonary arterial hypertension: opportunities, challenges and limitations. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21:181–190. doi: 10.1080/14728222.2017.1275567
  12. Li W, Salmon RM, Jiang H, Morrell NW. Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10. *Biochem Soc Trans.* 2016;44:1135–1141. doi: 10.1042/BST20160083
  13. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamandé N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige JJ, Bailly S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res.* 2008;102:914–922. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165530
  14. Star GP, Giovannazzo M, Langleben D. Bone morphogenetic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: a potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc Res.* 2010;80:349–354. doi: 10.1016/j.mvr.2010.05.010
  15. Park JE, Shao D, Upton PD, Desouza P, Adcock IM, Davies RJ, Morrell NW, Griffiths MJ, Wort SJ. BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS One.* 2012;7:e30075. doi: 10.1371/journal.pone.0030075
  16. Poirier O, Ciumas M, Eyries M, Montagne K, Nadaud S, Soubrier F. Inhibition of apelin expression by BMP signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303:C1139–C1145. doi: 10.1152/ajpcell.00168.2012
  17. Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, Lee SJ, Bidart M, Feige JJ, Bailly S. BMP9 and BMP10 are critical for post-natal retinal vascular remodeling. *Blood.* 2012;119:6162–6171. doi: 10.1182/blood-2012-01-407593
  18. Levet S, Ciais D, Merdzhanova G, Mallet C, Zimmers TA, Lee SJ, Navarro FP, Texier I, Feige JJ, Bailly S, Vittet D. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood.* 2013;122:598–607. doi: 10.1182/blood-2012-12-472142
  19. Gupta S, Gill D, Pal SK, Agarwal N. Activin receptor inhibitors—dalantercept. *Curr Oncol Rep.* 2015;17:14. doi: 10.1007/s11912-015-0441-5
  20. Long L, Ormiston ML, Yang X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2015;21:777–785. doi: 10.1038/nm.3877
  21. Gräf S, Haimel M, Bleda M, et al. Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun.* 2018;9:1416. doi: 10.1038/s41467-018-03672-4
  22. Wang G, Fan R, Ji R, Zou W, Penny DJ, Varghese NP, Fan Y. Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med.* 2016;16:17. doi: 10.1186/s12890-016-0183-7
  23. Eyries M, Montani D, Nadaud S, et al. Widening the landscape of heritable pulmonary hypertension mutations in pediatric and adult cases. [published online December 21, 2018]. *Eur Respir J.* 2018;1801371. doi: 10.1183/13993003.01371-2018
  24. Wang XJ, Lian TY, Jiang X, et al. Germline BMP9 mutation causes idiopathic pulmonary arterial hypertension. [published online December 21, 2018]. *Eur Respir J.* 2018;1801609. doi: 10.1183/13993003.01609-2018
  25. Perron JC, Dodd J. ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS One.* 2009;4:e8198. doi: 10.1371/journal.pone.0008198
  26. Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E, Bloch KD. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280:24443–24450. doi: 10.1074/jbc.M502825200
  27. Olsen OE, Sankar M, Elsaadi S, Hella H, Buene G, Darvekar SR, Misund K, Katagiri T, Knaus P, Holien T. BMPR2 inhibits activin and BMP signaling via wild-type ALK2. *J Cell Sci.* 2018;131:jcs.213512. doi: 10.1242/jcs.213512
  28. Nikolic I, Yung LM, Yang P, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a mechanistic biomarker of portopulmonary hypertension. [published online October 12, 2018]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018. doi: 10.1164/rccm.201807-1236OC
  29. Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous ME, Oh SP, Hale LP, Marchuk DA. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet.* 2003;12:473–482.
  30. Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM. Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation.* 2003;107:1653–1657. doi: 10.1161/01.CIR.0000058170.92267.00
  31. Roman BL, Pham VN, Lawson ND, Kulik M, Childs S, Lekven AC, Garrity DM, Moon RT, Fishman MC, Lechleider RJ, Weinstein BM. Disruption of acvr11 increases endothelial cell number in zebrafish cranial vessels. *Development.* 2002;129:3009–3019.
  32. Levet S, Ouarné M, Ciais D, Coutton C, Subileau M, Mallet C, Ricard N, Bidart M, Debillon T, Faravelli F, Rooryck C, Feige JJ, Tillet E, Bailly S. BMP9 and BMP10 are necessary for proper closure of the ductus arteriosus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112:E3207–E3215. doi: 10.1073/pnas.1508386112
  33. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:D34–D41. doi: 10.1016/j.jacc.2013.10.029
  34. Telli G, Tel BC, Yersal N, Korkusuz P, Gumusel B. Effect of intermedin/adrenomedullin2 on the pulmonary vascular bed in hypoxia-induced pulmonary hypertensive rats. *Life Sci.* 2018;192:62–67. doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.031
  35. Alastalo TP, Li M, Perez Vde J, Pham D, Sawada H, Wang JK, Koskenvuo M, Wang L, Freeman BA, Chang HY, Rabinovitch M. Disruption of PPAR $\gamma$ / $\beta$ -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest.* 2011;121:3735–3746. doi: 10.1172/JCI43382
  36. Star GP, Giovannazzo M, Langleben D. ALK2 and BMPR2 knockdown and endothelin-1 production by pulmonary microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2013;85:46–53. doi: 10.1016/j.mvr.2012.10.012
  37. Chen X, Orriols M, Walthers FJ, Laghmani EH, Hoogeboom AM, Hogen-Esch ACB, Hiemstra PS, Folkerts G, Goumans MTH, Ten Dijke P, Morrell NW, Wagenaar GTM. Bone morphogenetic protein 9 protects against neonatal hyperoxia-induced impairment of alveolarization and pulmonary inflammation. *Front Physiol.* 2017;8:486. doi: 10.3389/fphys.2017.00486
  38. Mitrofan CG, Appleby SL, Nash GB, Mallat Z, Chilvers ER, Upton PD, Morrell NW. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 enhance tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced monocyte recruitment to the vascular endothelium mainly via activin receptor-like kinase 2. *J Biol Chem.* 2017;292:13714–13726. doi: 10.1074/jbc.M117.778506
  39. Young K, Tweedie E, Conley B, Ames J, FitzSimons M, Brooks P, Liaw L, Vary CP. BMP9 Crosstalk with the hippo pathway regulates endothelial cell matrix and chemokine responses. *PLoS One.* 2015;10:e0122892. doi: 10.1371/journal.pone.0122892
  40. Le Hires M, Tu L, Ricard N, Phan C, Thuillet R, Fadel E, Dorfmueller P, Montani D, de Man F, Humbert M, Huertas A, Guignabert C. Proinflammatory signature of the dysfunctional endothelium in pulmonary hypertension. role of the macrophage migration inhibitory factor/CD74 complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:983–997. doi: 10.1164/rccm.201402-0322OC

[Click here to view linked References](#)

1 **Present and future treatments for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia**

2  
3  
4 Florian Robert<sup>1</sup>, Agnès Desroches-Castan<sup>1</sup>, Sabine Bailly<sup>1\*</sup>, Sophie Dupuis-Girod<sup>1, 2, 3\*</sup>, Jean-Jacques  
5 Feige<sup>1\*</sup>

6  
7  
8  
9  
10 1: Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CEA, Laboratory Biology of Cancer and Infection, F-38000 Grenoble,  
11 France.

12 2: Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme-Mère-Enfants, Service de Génétique, F-69677, Bron,  
13 France.

14 3 : Centre National de Référence pour la Maladie de Rendu-Osler, Bron, F-69677, France.  
15  
16  
17  
18  
19

20 \*: equal contributors  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

*Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia* (HHT), also known as Rendu-Osler syndrome, is a genetic vascular disorder affecting 1 in 5000-8000 individuals worldwide. This rare disease is characterized by various vascular defects including epistaxis, blood vessel dilations (telangiectasia) and arteriovenous malformations (AVM) in several organs. 90% of the cases are associated with heterozygous mutations of *ACVRL1* or *ENG* genes, that respectively encode a bone morphogenetic protein receptor (activin receptor-like kinase 1, ALK1) and a co-receptor named endoglin. Less frequent mutations found in the remaining 10% of patients also affect the gene *SMAD4* which is part of the transcriptional complex directly activated by this pathway. Presently, the therapeutic treatments for HHT are intended to reduce the symptoms of the disease. However, recent progress has been made using drugs that target VEGF (vascular endothelial growth factor) and the angiogenic pathway with the use of bevacizumab (anti-VEGF antibody). Furthermore, several exciting high-throughput screenings and preclinical studies have identified new molecular targets directly related to the signaling pathways affected in the disease. These include FKBP12, PI3-kinase and angiopoietin-2. This review aims at reporting these recent developments that should soon allow a better care of HHT patients.

## Keywords

hereditary hemorrhagic telangiectasia; vascular malformations; bone morphogenetic protein signaling; drug repositioning; bevacizumab; tacrolimus; ALK1; high throughput screening

## Background

*Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia* (HHT), also known as Rendu-Osler syndrome, is a genetic vascular disorder affecting 1 in 5000-8000 individuals worldwide, with regional differences and higher prevalence areas associated with founder effects (1-4). This rare disease is characterized by various vascular defects including epistaxis, blood vessel dilations (telangiectasia) and arteriovenous malformations (AVM) in several organs. 90% of the cases are associated with heterozygous mutations of *ACVRL1* or *ENG* genes, that respectively encode a bone morphogenetic protein receptor (activin receptor-like kinase 1, ALK1) and a co-receptor named endoglin. Less frequent mutations found in the remaining 10% of patients also affect genes that encode components of the BMP9/ALK1 signaling pathway. Presently, the therapeutic treatments for HHT are intended to reduce the symptoms of the disease. However, recent progress has been made using drugs that target VEGF (vascular endothelial growth factor) and the angiogenic pathway. A phase II study using intravenous bevacizumab for HHT patients complicated by severe liver involvement and cardiac impairment, highlighted the efficacy of this treatment, not only on the liver lesions, as shown by a decrease in the cardiac hyperflow secondary to liver vessel malformations, but also a significant improvement in nosebleeds, which considerably improved the quality of life of the patients. Furthermore, several exciting preclinical studies have identified new molecular targets directly related to the signaling pathways affected in the disease. This review aims at reporting these recent developments that should soon allow a better care of HHT patients.

## Main Text

### Clinical presentation of HHT

HHT is characterized by recurrent nosebleeds, usually starting in childhood, anemia, telangiectasia on the fingertips, the lips and along the gastrointestinal (GI) tract, and arteriovenous malformations (AVM) in the lungs, liver and the brain. These clinical features delineate the Curaçao criteria that are commonly used to establish the clinical diagnosis of HHT (5). Epistaxis is the most frequent clinical manifestation of HHT, affecting more than 95% of patients (6). It is repeated, irregular, linked to seasonal variations, suggesting some viral or allergic trigger, and can provoke anemia. It is also socially disruptive. Pulmonary AVMs are observed in 15-45% of patients but remain frequently undiagnosed and

1 asymptomatic. However, they may cause ischemic stroke, transient ischemic attack, cerebral abscesses,  
2 and asymptomatic cerebral infarction related to the right-left shunt responsible for paradoxical emboli,  
3 and in some severe cases, hypoxemia, hemoptysis, hemothorax (6, 7). Hepatic AVMS are observed in  
4 more than 70% of patients depending on the screening technique used but only 8% of patients will  
5 develop symptomatic liver disease (8). Intrahepatic shunts may cause high output cardiac failure, and  
6 more rarely biliary ischemia or portal hypertension. Gastrointestinal telangiectasias are quite frequent  
7 (70% of patients) and may lead to hemorrhages and anemia (9). Cerebral AVMs are less frequent (10-  
8 23% of HHT patients) but their consequences may be fatal.  
9

## 10 11 **Genetic and mechanistic presentation of HHT**

12  
13  
14 HHT is an autosomal dominant genetic disease that commonly results from monoallelic mutations in  
15 either *ENG* (HHT1, OMIM #187300) or *ACVRL1* (HHT2, OMIM #600376) genes (10, 11). *ACVRL1*  
16 encodes the BMP (Bone Morphogenetic Protein) receptor ALK1 (activin receptor-like kinase 1) whose  
17 expression is grossly restricted to the vascular and lymphatic endothelia (12, 13). Endoglin (encoded by  
18 *ENG*) is also an endothelial-specific receptor for BMPs which is devoid of intracellular kinase activity  
19 and acts as a co-receptor in complex with ALK1 (14, 15). Mutations of either one of these two genes are  
20 observed in 90% of the genetically screened patients, with a different balance between countries as close  
21 as France and the Netherlands that may result from founder effects or from differences between the two  
22 health systems in the clinical recruitment of patients (16, 17). In addition, mutations in *SMAD4* (encoding  
23 the transcription factor Smad4) have been described in a subset of HHT patients which present a juvenile  
24 polyposis/HHT overlap syndrome (HHT4, OMIM #175050) but the frequency of these mutations does  
25 not exceed 2 % of the HHT patient population (18, 19, 17). More recently, mutations in the *GDF2* gene  
26 (encoding BMP9) have been described in a vascular anomaly syndrome with phenotypic overlap with  
27 HHT (HHT5, OMIM #615506), but the contribution of *GDF2* mutations to HHT is estimated to be much  
28 less than 1% (20, 21).  
29  
30  
31  
32  
33

34 It is exciting to observe that the products of these 4 mutated genes all belong to the same signaling  
35 pathway (Figure 1). Homodimeric BMP9 and BMP10, as well as the recently characterized BMP9-  
36 BMP10 heterodimer, are high-affinity ligands of a receptor complex comprising ALK1, Endoglin and a  
37 BMP type II receptor (BMPRII or ACTRIIA or ACTRIIB) (22-24). Under activation by BMP9/10, this  
38 receptor complex phosphorylates the transcription factors Smad1, Smad5 or Smad9. Dimers of  
39 phospho-Smad1, phospho-Smad5 or phospho-Smad9 associate in a trimeric complex with Smad4 and  
40 translocate into the endothelial cell nucleus where they bind to BMP-responsive elements on the  
41 promoters of target genes and either enhance or repress their expression (25, 26). HHT is thus now  
42 considered as a disease of the BMP9/10 pathway rather than a disease of the TGF $\beta$  pathway, as initially  
43 thought (27).  
44  
45  
46

47 More than 350 distinct pathogenic mutations of *ACVRL1* and 400 pathogenic mutations of *ENG* have  
48 been reported in humans. They are registered in the ARUP database (<http://arup.utah.edu/database/hht/>).  
49 Mutations have been observed in all exons of both genes as well as in some intronic regions. Pathogenic  
50 mutations in the 5'-UTR (5'-untranslated region) of the *ENG* gene have also been reported (28).  
51 Missense mutations and genetic deletions are the most common types of mutations observed in both  
52 *ACVRL1* and *ENG*. Functional analysis of a series of 19 *ACVRL1* mutations in HHT2, distributed in  
53 regions coding the extracellular domain, the GS box (glycine/serine-rich box) or the serine/threonine  
54 kinase domain of the receptor, revealed that all mutants were expressed at the cell surface of transfected  
55 cells but were unable to activate Smad1/5 phosphorylation and BMP-responsive reporter gene  
56 expression (29). In addition, none of these mutants was able to act a dominant-negative repressor of  
57 wild-type receptor activity, indicating that HHT2 mutations in *ACVRL1* trigger functional  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

haploinsufficiency of BMP9 signaling (29). In contrast, *ENG* mutations in HHT1 induce protein loss-of-function through distinct mechanisms (30). Some endoglin mutants are unable to reach the plasma membrane during their biosynthesis and remain retained intracellularly. When retained in the endoplasmic reticulum, some mutants can dimerize with wild-type endoglin and impair its cell surface expression, acting as dominant-negative receptors, while other mutants cannot. Some mutants get normally expressed at the cell surface but are inactive such as mutants S278P and F282V that are unable to bind BMP9 (30). There is thus a greater diversity of functional consequences of *ENG* mutations than of *ACVRL1* mutations.

Mutations in *SMAD4* are detected in 1 to 2% suspected HHT clinical cases and are also frequently observed in the syndrome of juvenile polyposis (JP) and the mixed syndrome of HHT/JP (19, 31, 32). Therefore, any HHT patient with *SMAD4* mutation is at risk of early onset gastrointestinal cancer developing on a background of intestinal polyps. The nearly 100 *SMAD4* mutations identified in JP patients are distributed throughout the gene and include nonsense, missense, frameshift, splice site mutations as well as partial or entire gene deletions, consistent with the inheritance of a loss-of-function allele (31, 32). In the combined JP/HHT syndrome, although initial reports suggested that mutations were clustered in the C-terminal MH2 (Mad-homology 2) domain, this tendency was not confirmed by subsequent studies which reported that mutations in other parts of the *SMAD4* gene also caused JP/HHT (18, 19, 31).

In 2013, the team of Pinar Bayrak-Toydemir identified *GDF2* gene mutations (encoding BMP9) in 3 unrelated HHT patients who had previously been tested negative for *ACVRL1*, *ENG* or *SMAD4* mutations (20). These observations remained isolated and it is now admitted that these mutations are extremely rare in HHT. In contrast, recent studies have reported a number of PAH (Pulmonary Arterial Hypertension) cases associated with *BMP9* and more rarely *BMP10* mutations (33-35). Whereas *BMPR2* mutations are the most frequent cause of heritable forms of PAH, *BMP9* mutations were observed in 6.7% of the patients in the Chinese study (35) and 1.2% of the patients in the French study (33). It is extremely surprising that germinal mutations of components of the same pathway (*BMP9-10/ALK1/ENG/BMPR2/SMAD1-5-9/SMAD4*) trigger two distinct genetic diseases, HHT and PAH, affecting distinct vascular beds. Figure 1 presents the different mutations observed in HHT and PAH, that all affect components of the BMP9/BMP10 signaling pathway.

As the clinical penetrance of the disease is highly variable, even within members of the same family bearing the same mutation, and since the vascular defects preferentially concern certain vascular beds (liver, lungs, brains) and develop in localized regions of the affected organs, it has long been postulated that a second local hit might be required to initiate the pathological process. On animal models of HHT, Paul Oh has elegantly shown that a local injury (e.g. burn wounding of a mouse ear) triggers an abnormal revascularization (with dilated and tortuous vessels resembling HHT arteriovenous malformations) in *Alk1*-deficient mice (36). Increased tissue perfusion provoked by a local VEGF (vascular endothelial growth factor) surge has also been reported to trigger capillary dysplasia in the brain of *Alk1* heterozygous mice (37). Even more interestingly, Doug Marchuk's team has recently identified low-frequency somatic mutations in 9/19 human telangiectasias analyzed by deep sequencing and has confirmed on 7 samples that the germline and somatic mutations exist in trans configuration, resulting in a biallelic loss of either the *ENG* or the *ACVRL1* gene (38). This would suggest that the second hit could be a genetic somatic mutation.

In adults, BMP9 and BMP10 are mainly produced by the liver and the right cardiac atria, respectively. They are present in the blood circulation under both homodimeric and heterodimeric forms (39, 24). All forms bind a hetero-tetrameric complex of type I (ALK1) and type II (BMPRII or Activin RIIA) receptors present at the surface of endothelial cells and induce either stimulation or repression of target

1 gene expression in a phospho-Smad-dependent manner, as indicated above (25). ALK1 activation can  
2 also induce non-Smad signaling such as activation of mitogen-activated protein kinases (MAP-kinases)  
3 including p38, ERK and JNK. ALK1 can also cross-talk with the VEGF, angiopoietin 2, Notch and  
4 Hippo pathways (25). The main biological output of BMP9/10 signaling is the induction of vascular  
5 quiescence (40, 41). Vascular endothelial cells are under constant influence of pro- and anti-angiogenic  
6 factors and the dysregulation of this balance triggers active angiogenesis or vascular quiescence. As  
7 shown in Figure 2, BMP9 effects on endothelial cells appear to be mediated by a combination of diverse  
8 mechanisms. On one hand, BMP9 activates the endothelial cell expression of VEGFR1, a high-affinity  
9 non-signaling receptor that serves as a decoy receptor and down-regulates the pro-angiogenic action of  
10 VEGF through its signaling receptor VEGFR2 (42, 43). In parallel, BMP9 represses the endothelial  
11 expression of ANGPT2 (angiopoietin-2), another pro-angiogenic growth factor that acts via the tyrosine  
12 kinase receptor Tie2 (44, 45). On the other hand, BMP9 down-regulates both expression and  
13 phosphorylation of PTEN (Phosphatase and TENSin homolog), leading in turn to increased PTEN  
14 activity and decreased activity of PI3K (phosphatidylinositol-4,5 biphosphate 3-kinase) and Akt, two  
15 key components of the VEGF and ANGPT2 signaling pathways (46-49).  
16  
17  
18  
19  
20

## 21 **Present treatments for HHT:**

22 Most treatments are symptomatic and not pathophysiological.  
23

### 24 *Epistaxis:*

25 There is no current surgical or medical treatment that makes it possible to cure the nosebleeds  
26 definitively. The repetition of these treatments is often the source of significant iatrogenic conditions,  
27 including the perforation of the nasal septum, resulting in a worsening of the nosebleeds. No study has  
28 shown efficacy with a “high level of proof” for any medical or surgical treatment.  
29  
30  
31  
32  
33

34 Treatment by estrogens and progestrogens has been tested with some success, but the treatment is  
35 somewhat problematic in men and the indication for these drugs in menopausal women over 50 is  
36 debatable with recent observations showing their adverse carcinogenic and cardiovascular effects.  
37 Tranexamic acid, an anti-fibrinolytic drug, has been used in the treatment of HHT-related epistaxis (50-  
38 52) and is prescribed in European countries but its efficacy remains moderate (53).  
39  
40

### 41 *Telangiectasia:*

42 The use of a long-pulsed Nd:YAG laser is efficient and safe for the treatment of cutaneous and labial  
43 telangiectases in patients with HHT (54).  
44  
45

### 46 *Pulmonary arteriovenous malformations (PAVM):*

47 Transcatheter vaso-occlusion of PAVMs using detachable steel coils has become the mainstay of  
48 treatment. It has been found to be effective and to have a good safety profile (55-60). Less frequently,  
49 detachable balloons or Amplatzer occluders can be used to treat PAVMs with a very large feeding artery.  
50 Treatment of PAVMs is particularly indicated when the feeding vessel of the PAVM is  $\geq 3$  mm in  
51 diameter (55).  
52  
53  
54

### 55 *Cerebral and spinal AVM:*

56 Even if CAVMs are frequent in asymptomatic HHT patients, series have suggested that the risk of  
57 intracranial brain hemorrhage in HHT patients was lower than in sporadic CAVM patients (61).  
58 Screening and treatment of CAVMs in asymptomatic patients is matter of some debate. Complicated  
59 cerebral or spinal AVMs must be treated. Various therapies for spinal and cerebral AVMs have been  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 proposed, including surgical resection, stereotactic radiosurgery, embolization or a combination of these  
2 treatments. Regardless of the method chosen, the treatment of cerebral arteriovenous malformations  
3 must be carried out in a center that has experience with neurovascular diseases. Treatment of  
4 asymptomatic cerebral AVMs is more controversial.

#### 6 *Gastrointestinal AVM:*

7 Patients with gastrointestinal hemorrhage or severe anemia unexplained by the epistaxis are explored by  
8 endoscopic screening. Medical treatments have not shown any benefit. Treatment of iron deficiency and  
9 anemia includes iron replacement and blood transfusions if necessary. Currently, local endoscopic  
10 therapy, using argon plasma coagulation or ND-YAG laser is recommended to prevent relapse of GI  
11 bleeding (62, 63).

#### 15 *Hepatic AVM:*

17 Most patients with hepatic involvement in HHT are asymptomatic and do not justify any treatment. The  
18 intensive treatment approach is recommended for symptomatic liver shunts and depends on the type of  
19 complication. High output cardiac failure is first treated medically using diuretics and beta blockers, plus  
20 correction of the anemia and arrhythmia (atrial fibrillation). Portal hypertension should be treated as is  
21 recommended for cirrhotic patients. Biliary necrosis has a poor prognosis and is treated with antibiotics.  
22 Orthotopic liver transplantation (OLT) should be considered only in patients failing to respond to  
23 intensive treatment. OLT has been proposed as the only definitive curative option for hepatic  
24 arteriovenous malformations in HHT in cases of biliary necrosis and cardiac failure (64, 65). However,  
25 the optimal timing for liver transplantation is still under discussion as the mortality and morbidity rates  
26 following transplant remain a limiting factor.

#### 32 *Anti-angiogenic therapies :*

33 More recently, a physiopathological approach has been proposed using anti-angiogenic treatments (66).  
34 Indeed, in 2006 and 2008, 2 case-reports have presented the use of bevacizumab treatment, with  
35 spectacular improvements in patients with HHT complicated by severe liver involvement and cardiac  
36 impairment (67, 68).

39 Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody that selectively binds to and neutralizes  
40 the biologic activity of human vascular endothelial growth factor (VEGF). Bevacizumab inhibits the  
41 binding of VEGF to its receptors, Flt-1 and KDR, on the surface of endothelial cells.

44 This first phase II study using intravenous bevacizumab for HHT patients complicated by severe liver  
45 involvement and cardiac impairment, highlighted the efficacy of this treatment, not only on the liver  
46 lesions, as shown by a decrease in the cardiac hyperflow secondary to the liver vessel malformations,  
47 but also a significant improvement in nosebleeds, which considerably improved the quality of life of the  
48 patients (69). No severe adverse events related to bevacizumab have been observed.

51 Since then, many case reports showing dramatic improvement of HHT bleedings (epistaxis and digestive  
52 bleedings) after bevacizumab treatment have been published (67, 70-76) and this treatment is now  
53 considered in HHT patients with refractory GI bleeding (77). The first randomized phase III clinical trial  
54 to study bevacizumab efficiency and safety is ongoing (NCT 03227263).

#### 57 *Other anti-angiogenic drugs are currently tested in HHT:*

58 Among tyrosine kinase inhibitors are some anti-angiogenic molecules which are available orally and  
59 could therefore overcome the difficulties encountered with bevacizumab.  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Tyrosine kinase inhibitors (e.g. Nintedanib and Pazopanib) are small molecules that target the  
2 intracellular kinase domain of the VEGF receptor. The tyrosine kinase inhibitor Nintedanib targets  
3 growth factor receptors involved in angiogenesis. Most importantly, it inhibits the platelet-derived  
4 growth factor receptor, fibroblast growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor.  
5 The potential therapeutic effects of four anti-angiogenic tyrosine-kinase inhibitors in the development  
6 of adult-onset AVMs in a murine model of HHT was evaluated (78). They concluded that Sorafenib and  
7 a Pazopanib analogue (GW771806) significantly improved hemoglobin level and gastro-intestinal  
8 bleeding whereas they were not effective in preventing wound-induced skin AVMs.  
9

10 Nintedanib has been used in one HHT patient following the diagnosis of Interstitial Pulmonary Fibrosis  
11 (79) with encouraging results. His Epistaxis Severity Score significantly decreased.  
12

13 Pazopanib, another tyrosine kinase inhibitor, has been tested at a dose of 50 mg/day in HHT by Faughnan  
14 et al. (80) and showed promising results in treatment of HHT-related bleeding (NCT02204371).  
15 Unfortunately, this industrial study was stopped but two other studies are planned in North America  
16 using this drug (NCT03850730 and NCT03850964).  
17

18 In France, we are implementing a multicenter, randomized, drug versus placebo study to evaluate  
19 efficacy of nintedanib treatment *per os* on epistaxis duration in HHT patients with moderate to severe  
20 epistaxis (NCT03954782).  
21  
22

#### 23 *Thalidomide:*

24 Thalidomide and lenalidomide, have well-known anti-angiogenic effects which are dose-dependent (81).  
25 Thalidomide treatment induced vessel maturation in an experimental model of HHT and decreased  
26 epistaxis in 6 HHT patients (82). Reduced bleeding has been observed in HHT patients who received  
27 thalidomide as an antiangiogenic cancer therapy (83, 84). In case reports and a few small studies in HHT,  
28 thalidomide consistently decreased severity and frequency of epistaxis and improved hemoglobin blood  
29 concentrations, thereby decreasing the need for transfusion (85-88). However, placebo-controlled  
30 studies are definitely needed to confirm efficacy and safety of thalidomide and lenalidomide in HHT.  
31

32 Furthermore, the use of thalidomide is limited by safety data. Indeed, thalidomide doses  $\geq 100$  mg per  
33 day can cause peripheral neuropathy, deep vein thrombosis, somnolence and constipation. Lenalidomide  
34 inhibits VEGF production and has an improved safety profile, as compared to thalidomide. The most  
35 common side effects of lenalidomide are anemia, constipation and drowsiness (81).  
36  
37  
38  
39  
40  
41

#### 42 **Future and alternative treatments for HHT:**

43 Although current treatments succeed pretty well at reducing recurrent epistaxis, there is still a need for  
44 « magic bullets » allowing to revert telangiectasias and AVMs into a normal vasculature and to definitely  
45 cure the disease. Now that the genetic studies have pointed to a precise signaling pathway, one can  
46 envision to develop targeted therapies or to find existing drugs that would target the  
47 BMP9/ALK1/ENG/SMAD pathway. Since the disease occurs in heterozygous patients and results from  
48 haploinsufficiency, a rather simplistic strategy would consist in reactivating this pathway in endothelial  
49 cells in order to recover the signaling level of homozygous cells. In other terms, if a drug could double  
50 the rate of Smad 1/5 phosphorylation by wild type ALK1, then the endothelial cells of HHT patients  
51 bearing 50% of wild type ALK1 receptors should behave as normal biallelic cells and the disease might  
52 reverse.  
53

54 Based on this reasoning, a number of teams have attempted to screen libraries of FDA (Food and Drug  
55 Administration)- or EMA (European Medicines Agency)-approved drugs that could potentiate the  
56 BMP9 signaling response. This drug repositioning approach is particularly interesting for rare diseases  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 as the economical equation does not allow the development of expensive large-scale clinical assays for  
2 the validation of brand-new drugs. In that case, as the safety issues have already been treated, the drugs  
3 validated on cellular assays in the research laboratory can then be very rapidly translated into clinical  
4 assays.

5 Finding the best readout to screen molecules potentiating the BMP9 pathway is a complex task since the  
6 signaling pathway is quite direct, with BMP9 receptors phosphorylating the Smad1/5 transcription  
7 factors that will, in turn, translocate to the nucleus and trigger the transcriptional response. In order to  
8 detect drugs that can act on most numerous steps, the best method appears to measure the transcriptional  
9 activation of a BMP9-responsive gene. For the sake of easiness and efficacy, the most commonly used  
10 reporter gene encodes firefly luciferase driven by an artificial promoter comprising tandem repeats of  
11 the BMP-response element of the Id1 (Inhibitor of differentiation-1) gene promoter (89).

12 Zilberberg et al. have generated a C2C12 myoblastic cell line stably expressing this construct  
13 (C2C12BRA) which provides a highly sensitive assay to measure BMP activities (90). This cell line has  
14 been used by two groups to reposition FDA-approved drugs for PAH and HHT. Spiekerkoetter *et al.*  
15 and Ruiz *et al.* respectively screened 3756 FDA-approved drugs (NIH-CC, LOPAC, Biomol ICCB  
16 KnownBioactives, Microsource spectrum, Biomol FDA-approved drug libraries) and 700 FDA-  
17 approved drugs (NIH Clinical, NCCS) on C2C12BRA cells (91, 92). The group of Spiekerkoetter  
18 screened for agents able to stimulate luciferase expression and activity in the absence or the presence of  
19 low concentrations of exogenous ligand (250pM BMP4 = EC20). The best three hits were  
20 immunosuppressant agents: FK506 (tacrolimus), ascomycin and rapamycin (Sirolimus). The group of  
21 Ruiz performed a similar screen in C2C12BRA cells in the presence of BMP9 (0.5 ng/ml = EC<sub>50</sub>).  
22 Interestingly, the most potent activating drug that they found was again tacrolimus. Together, these two  
23 high-throughput screens clearly identified tacrolimus as a potent activator of the BMP9-ALK1-BMP2-  
24 Smad1/5/9 signaling cascade. How tacrolimus activates this pathway is still not completely understood.  
25 Tacrolimus (FK506) can bind to FKBP12 (FK-506-binding protein-12), a protein known to interact with  
26 the TGF- $\beta$  family type I receptors on their glycine-serine-rich phosphorylation domains and to repress  
27 the receptors' kinase activity in the absence of their ligands. Tacrolimus was shown indeed to displace  
28 FKBP12 from ALK1, ALK2 as well as ALK3 and to stimulate their kinase activity, explaining how it  
29 potentiates both the BMP9 response (through ALK1) and the BMP4 response (through ALK3) (91).  
30 Alternatively, tacrolimus was also reported to stimulate Endoglin and ALK-1 expression by endothelial  
31 cells (93). Tacrolimus has been tested in several mouse and rat models for both PAH and HHT.  
32 Tacrolimus reduced pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxia in mice with  
33 conditional deletion of *Bmpr2* in endothelial cells and similarly reversed monocrotaline-induced PAH  
34 in rats (91). In parallel, tacrolimus also decreased the number of retinal arteriovenous malformations  
35 induced by BMP9/10-immunodepletion in mice (HHT model) (92). These preclinical works support that  
36 tacrolimus repurposing has therapeutic potential in PAH and HHT. Sirolimus (rapamycin) and  
37 tacrolimus also inhibit mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) which is downstream of PI3K and  
38 Akt and this could be another mechanism by which these drugs target this pathway.

39 Another ongoing approach uses phenotypic screening of siRNA-silenced endothelial cells. The company  
40 Recursion Pharmaceuticals is currently using ALK1-silenced endothelial cells in order to identify drugs  
41 that reverse the ALK1 siRNA-induced phenotype (94). They have already validated this strategy of  
42 repurposing drugs for the treatment of cerebral cavernous malformations (95).

#### 53 *Clinical assays with Tacrolimus and Sirolimus:*

54 A case report previously described that when Sirolimus was given following liver transplantation to a  
55 patient with HHT who had multiple arteriovenous malformations, it was noted that internal and external  
56 telangiectasia, epistaxis, and anemia disappeared, suggesting that the mechanism of action of sirolimus  
57 involved partial correction of endoglin and ALK1 haploinsufficiency (96). Interestingly, it was already  
58 observed that, in HHT patients with hepatic AVMs and high-output cardiac failure that undergo a liver  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 transplantation and receive immunosuppressive treatments with tacrolimus or sirolimus, their epistaxes  
2 improved dramatically (65) and their mucosal bleedings stopped. Their hemoglobin levels normalized  
3 and cutaneous and gastrointestinal telangiectases disappeared.

4 All these observations prompted us to set up a recent clinical trial to evaluate nasal topical administration  
5 of tacrolimus in HHT patients. This phase II multicenter, randomized study (NCT03152019) was carried  
6 out in double blind in order to evaluate the efficacy of this nasal ointment. This ointment is administered  
7 for 6 weeks to patients with HHT complicated by nosebleeds and the final readout is the duration of  
8 nosebleeds 6 weeks after the end of the treatment. Results are encouraging but not yet published.

9 Interestingly, a case report of a patient suffering from both HHT and PAH was recently published that  
10 showed that treatment with oral low-dose tacrolimus improved his HHT-associated epistaxis but did not  
11 attenuate PAH progression (97).

12 More recently, sirolimus (rapamycin), which also binds FK-binding protein-12 (FKBP12), was reported  
13 to be efficient and safe for the treatment of blue rubber bleb nevus syndrome, a rare multifocal venous  
14 malformation syndrome involving predominantly the skin and gastrointestinal tract (98), as well as for  
15 other venous and lymphaticovenous malformations (99).

## 21 **Conclusions:**

22 Since the discovery of the *ENG* and *ACVRL1* gene mutations responsible for HHT, some 25 years ago  
23 (10, 11), significant progress has been made in the comprehension of the biological mechanisms of this  
24 pathology. It took about ten more years to identify the high-affinity ligands of the ALK1/Endoglin  
25 receptor complex, namely BMP9 and BMP10 (22) and this has paved the way for a better understanding  
26 of the multiple biological effects physiologically mediated by these receptors. It is now commonly  
27 admitted that these two BMPs trigger microvascular endothelial cell quiescence (40, 100, 101, 27, 102,  
28 103, 41) and that alterations of the BMP9/BMP10/ALK1/Endoglin/Smad1-5-4 pathway in mice causes  
29 vascular remodeling and AVM formation (104-107, 46, 108, 109, 48, 45).

30 These fundamental discoveries have not yet completely translated into clinical applications. Whereas  
31 HHT was essentially treated symptomatically or through hepatic transplantations for the more severe  
32 cases (6, 65), it is only in 2012 that the first efficient mechanism-driven treatment was shown to be  
33 effective. Although its precise mechanism of action still remains to be understood in the context of HHT,  
34 Bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody demonstrated remarkable efficacy in the treatment of  
35 epistaxis and cardiac failures of HHT patients (69). Similarly, the orally available multi-tyrosine kinase  
36 inhibitors that target VEGFR2 (e.g. Pazopanib) represent an alternative treatment that targets the same  
37 pathway. It is hypothesized that neutralization of VEGF re-equilibrates the balance between pro- and  
38 anti-angiogenic factors that is altered by the inactivation of the pro-quiescence BMP9 pathway (Figure  
39 3). Anti-ANGPT2 antibodies and inhibitors of PI3 Kinase (Figure 3) have also proven efficacy in  
40 preclinical models such as *Alk1-KO*, *Smad4-KO* mice, or mice treated with neutralizing anti-  
41 BMP9/BMP10 antibodies and are interesting candidates for clinical trials in HHT patients (46, 47, 45).

42 It is puzzling that no etiological treatment targeting the mutated components of this signaling pathway  
43 has reached the market so far. This review points out that several screenings of FDA- and EMA-drugs  
44 are ongoing and have identified encouraging candidate drugs such as Tacrolimus and Sirolimus (92, 97)  
45 (Figure 3). It is thus reasonably predictable that mechanism-driven drugs will soon prove efficacy for  
46 the treatment of HHT patients and enter clinical assays.

## 54 **List of abbreviations:**

55 HHT: hereditary hemorrhagic telangiectasia; GI tract: gastro-intestinal tract; AVM: arteriovenous  
56 malformation; BMPx: bone morphogenetic protein X; *ACVRL1* gene: activin receptor-like kinase 1  
57 gene; *ENG* gene: endoglin gene; ALKx: activin receptor-like kinase X; BMPRII: bone morphogenetic  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 protein receptor II, ACTRIIA/B: activin receptor type IIA/B; 5'-UTR: 5'-untranslated region; GS box:  
2 glycine- and serine-rich box; JP: juvenile polyposis; MH2: Mad-homology 2; *GDF2* gene: growth and  
3 differentiation factor 2/bone morphogenetic protein 9 gene; PAH: pulmonary arterial hypertension;  
4 VEGF: vascular endothelial growth factor; VEGFR1/2: vascular endothelial growth factor 1/2;  
5 ANGPT2: angiopoietin 2; PTEN: phosphatase and tensin homolog; PI3K: phosphatidylinositol-4,5  
6 bisphosphate 3-kinase; Akt: AKT serine/threonine protein-kinase; PAVM: pulmonary arteriovenous  
7 malformation; CAVM: cerebral arteriovenous malformation; OLT: orthotopic liver transplantation;  
8 FDA: food and drug administration; EMA: European medicines Agency; FKBP12: FK-506-binding  
9 protein-12; mTOR: mammalian target of rapamycin;

## 13 **Declarations:**

14 All authors have given consent for publication. The authors declare that they have no competing interest.  
15 All data generated or analysed during this study are included in this published article. This research was  
16 supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, U1036), Commissariat  
17 à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA, DRF/IRIG/DS/BCI), University Grenoble-  
18 Alpes (BCI), Hospices Civils de Lyon (Department of Genetics), the Association Maladie de Rendu-  
19 Osler (AMRO-HHT France) and the Fondation Maladies Rares. The French National HHT Reference  
20 Centre ([www.rendu-osler.fr](http://www.rendu-osler.fr)) is supported by the French Ministry of Health and the Hospices Civils de  
21 Lyon.  
22

23  
24 FR and AC wrote a bibliographical synopsis about the recent experimental treatments developed for  
25 HHT, SDG wrote the description of current clinical treatments for HHT, SB and JJF wrote the  
26 mechanistic description of HHT, conceived Figures 1, 2 and 3 and coordinated the writing of the  
27 manuscript. All authors read and approved the final manuscript. SDG is a clinician in charge of the  
28 French National HHT Reference Center and has a long-time expertise in HHT patients genetic testing  
29 and medical care. FR, AC, SB and JJF are basic researchers deciphering the BMP9/ALK1 signaling  
30 pathway since many years and seeking for new etiological treatments for HHT.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

## 38 **References:**

- 39 1. Plauchu H, de Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM. Age-related clinical profile of hereditary  
40 hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet.* 1989;32:291-  
41 7.
- 42 2. Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI, Jr. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.*  
43 1995;333:918-24.
- 44 3. Lesca G, Genin E, Blachier C, Olivieri C, Coulet F, Brunet G, et al. Hereditary hemorrhagic  
45 telangiectasia: evidence for regional founder effects of ACVRL1 mutations in French and Italian  
46 patients. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:742-9.
- 47 4. Govani FS, Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur*  
48 *J Hum Genet.* 2009;17:860-71.
- 49 5. Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, et al.  
50 Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J*  
51 *Med Genet.* 2000;91:66-7.
- 52 6. Dupuis-Girod S, Bailly S, Plauchu H. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology  
53 to patient care. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1447-56.
- 54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

7. Dupuis-Girod S, Cottin V, Shovlin CL. The Lung in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Respiration*. 2017;94:315-30.
8. Buscarini E, Plauchu H, Garcia Tsao G, White RI, Jr., Sabba C, Miller F, et al. Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia: consensus recommendations. *Liver Int*. 2006;26:1040-6.
9. Kjeldsen AD, Kjeldsen J. Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:415-8.
10. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994;8:345-51.
11. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, et al. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*. 1996;13:189-95.
12. Seki T, Yun J, Oh SP. Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res*. 2003;93:682-9.
13. Niessen K, Zhang G, Ridgway JB, Chen H, Yan M. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*. 2010;115:1654-61.
14. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1990;265:8361-4.
15. Saito T, Bokhove M, Croci R, Zamora-Caballero S, Han L, Letarte M, et al. Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction: Insights into BMP Signaling and HHT1. *Cell Rep*. 2017;19:1917-28.
16. Letteboer TG, Zewald RA, Kamping EJ, de Haas G, Mager JJ, Snijder RJ, et al. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Hum Genet*. 2005;116:8-16.
17. Lesca G, Burnichon N, Raux G, Tosi M, Pinson S, Marion MJ, et al. Distribution of ENG and ACVRL1 (ALK1) mutations in French HHT patients. *Hum Mutat*. 2006;27:598.
18. Gallione CJ, Repetto GM, Legius E, Rustgi AK, Schelley SL, Tejpar S, et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*. 2004;363:852-9.
19. Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, et al. SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet*. 2006;43:793-7.
20. Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*. 2013;93:530-7.
21. Hernandez F, Huether R, Carter L, Johnston T, Thompson J, Gossage JR, et al. Mutations in RASA1 and GDF2 identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Genome Var*. 2015;2:15040.
22. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109:1953-61.
23. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007;120:964-72.
24. Tillet E, Ouarne M, Desroches-Castan A, Mallet C, Subileau M, Didier R, et al. A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma. *J Biol Chem*. 2018;293:10963-74.
25. Garcia de Vinuesa A, Abdelilah-Seyfried S, Knaus P, Zwijsen A, Bailly S. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;27:65-79.
26. Goumans MJ, Zwijsen A, Ten Dijke P, Bailly S. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;10:a031989.

27. Tillet E, Bailly S. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 2014;5:456.
28. Damjanovich K, Langa C, Blanco FJ, McDonald J, Botella LM, Bernabeu C, et al. 5'UTR mutations of ENG cause hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:85.
29. Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, et al. Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood.* 2010;116:1604-12.
30. Mallet C, Lamribet K, Giraud S, Dupuis-Girod S, Feige JJ, Bailly S, et al. Functional analysis of endoglin mutations from hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 patients reveals different mechanisms for endoglin loss of function. *Hum Mol Genet.* 2015;24:1142-54.
31. Gallione C, Aylsworth AS, Beis J, Berk T, Bernhardt B, Clark RD, et al. Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:333-9.
32. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet.* 2015;6:1.
33. Eyries M, Montani D, Nadaud S, Girerd B, Levy M, Bourdin A, et al. Widening the landscape of heritable pulmonary hypertension mutations in paediatric and adult cases. *Eur Respir J.* 2019;53.
34. Morrell NW. Finding the needle in the haystack: BMP9 and 10 emerge from the genome in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2019;53:1900078.
35. Wang XJ, Lian TY, Jiang X, Liu SF, Li SQ, Jiang R, et al. Germline BMP9 mutation causes idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2019;53:1801609.
36. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, Choi EJ, Fliess N, Choe SW, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 2009;119:3487-96.
37. Hao Q, Su H, Marchuk DA, Rola R, Wang Y, Liu W, et al. Increased tissue perfusion promotes capillary dysplasia in the ALK1-deficient mouse brain following VEGF stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H2250-6.
38. Snellings D, Gallione C, Clark D, Vozoris N, Faughnan M, Marchuk D. Somatic mutations in vascular malformations of hereditary hemorrhagic telangiectasia results in biallelic loss of ENG or ACVRL1. *BioRxiv.* 2019;731588.
39. Bidart M, Ricard N, Levet S, Samson M, Mallet C, David L, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69:313-24.
40. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamande N, Gasc JM, Dupuis-Girod S, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res.* 2008;102:914-22.
41. Wood JH, Guo J, Morrell NW, Li W. Advances in the molecular regulation of endothelial BMP9 signalling complexes and implications for cardiovascular disease. *Biochem Soc Trans.* 2019;47:779-91.
42. Larrivee B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, Duarte A, et al. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell.* 2012;22:489-500.
43. Thalgott JH, Dos-Santos-Luis D, Hosman AE, Martin S, Lamande N, Bracquart D, et al. Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Contributes to the Pathogenesis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2. *Circulation.* 2018;138:2698-712.
44. Ruiz S, Zhao H, Chandakkar P, Chatterjee PK, Papoin J, Blanc L, et al. A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary-delivered immunoblocking of BMP9 and BMP10. *Sci Rep.* 2016;5:37366.
45. Crist AM, Zhou X, Garai J, Lee AR, Thoele J, Ullmer C, et al. Angiopoietin-2 Inhibition Rescues Arteriovenous Malformation in a Smad4 Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Mouse Model. *Circulation.* 2019;139:2049-63.

- 1 46. Ola R, Dubrac A, Han J, Zhang F, Fang JS, Larrivee B, et al. PI3 kinase inhibition improves vascular  
2 malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun.* 2016;7:13650.
- 3 47. Alsina-Sanchis E, Garcia-Ibanez Y, Figueiredo AM, Riera-Domingo C, Figueras A, Matias-Guiu X,  
4 et al. ALK1 Loss Results in Vascular Hyperplasia in Mice and Humans Through PI3K Activation.  
5 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:1216-29.
- 6 48. Ola R, Kunzel SH, Zhang F, Genet G, Chakraborty R, Pibouin-Fragner L, et al. SMAD4 Prevents  
7 Flow Induced Arteriovenous Malformations by Inhibiting Casein Kinase 2. *Circulation.* 2018;138:2379-  
8 94.
- 9 49. Iriarte A, Figueras A, Cerda P, Mora JM, Jugla A, Penin R, et al. PI3K (Phosphatidylinositol 3-  
10 Kinase) Activation and Endothelial Cell Proliferation in Patients with Hemorrhagic Hereditary  
11 Telangiectasia Type 1. *Cells.* 2019;8.
- 12 50. Klepfish A, Berrebi A, Schattner A. Intranasal tranexamic acid treatment for severe epistaxis in  
13 hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Arch Intern Med.* 2001;161:767.
- 14 51. Sabba C, Gallitelli M, Palasciano G. Efficacy of unusually high doses of tranexamic acid for the  
15 treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2001;345:926.
- 16 52. Lozano M. Tranexamic acid in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2002;346:457.
- 17 53. Gaillard S, Dupuis-Girod S, Boutitie F, Riviere S, Moriniere S, Hatron PY, et al. Tranexamic acid  
18 for epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia patients: a European cross-over controlled trial in  
19 a rare disease. *J Thromb Haemost.* 2014;12:1494-502.
- 20 54. Lyons GD, Owens RE, Mouney DF. Argon laser destruction of cutaneous telangiectatic lesions.  
21 *Laryngoscope.* 1981;91:1322-5.
- 22 55. White RI, Jr., Lynch-Nyhan A, Terry P, Buescher PC, Farmllett EJ, Charnas L, et al. Pulmonary  
23 arteriovenous malformations: techniques and long-term outcome of embolotherapy. *Radiology.*  
24 1988;169:663-9.
- 25 56. Chilvers ER, Whyte MK, Jackson JE, Allison DJ, Hughes JM. Effect of percutaneous transcatheter  
26 embolization on pulmonary function, right-to-left shunt, and arterial oxygenation in patients with  
27 pulmonary arteriovenous malformations. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:420-5.
- 28 57. Dutton JA, Jackson JE, Hughes JM, Whyte MK, Peters AM, Ussov W, et al. Pulmonary  
29 arteriovenous malformations: results of treatment with coil embolization in 53 patients. *AJR Am J*  
30 *Roentgenol.* 1995;165:1119-25.
- 31 58. Gupta P, Mordin C, Curtis J, Hughes JM, Shovlin CL, Jackson JE. Pulmonary arteriovenous  
32 malformations: effect of embolization on right-to-left shunt, hypoxemia, and exercise tolerance in 66  
33 patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2002;179:347-55.
- 34 59. Mager JJ, Overtom TT, Blauw H, Lammers JW, Westermann CJ. Embolotherapy of pulmonary  
35 arteriovenous malformations: long-term results in 112 patients. *J Vasc Interv Radiol.* 2004;15:451-6.
- 36 60. Pollak JS, Saluja S, Thabet A, Henderson KJ, Denbow N, White RI, Jr. Clinical and anatomic  
37 outcomes after embolotherapy of pulmonary arteriovenous malformations. *J Vasc Interv Radiol.*  
38 2006;17:35-44; quiz 5.
- 39 61. Willemse RB, Mager JJ, Westermann CJ, Overtom TT, Mauser H, Wolbers JG. Bleeding risk of  
40 cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg.* 2000;92:779-84.
- 41 62. Bown SG, Swain CP, Storey DW, Collins C, Matthewson K, Salmon PR, et al. Endoscopic laser  
42 treatment of vascular anomalies of the upper gastrointestinal tract. *Gut.* 1985;26:1338-48.
- 43 63. Sargeant IR, Loizou LA, Rampton D, Tulloch M, Bown SG. Laser ablation of upper gastrointestinal  
44 vascular ectasias: long term results. *Gut.* 1993;34:470-5.
- 45 64. Lerut J, Orlando G, Adam R, Sabba C, Pfitzmann R, Klempnauer J, et al. Liver transplantation for  
46 hereditary hemorrhagic telangiectasia: Report of the European liver transplant registry. *Ann Surg.*  
47 2006;244:854-62.
- 48 65. Dupuis-Girod S, Chesnais AL, Ginon I, Dumortier J, Saurin JC, Finet G, et al. Long-term outcome  
49 of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic involvement after orthotopic  
50 liver transplantation: a single-center study. *Liver Transpl.* 2010;16:340-7.
- 51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

66. Ardelean DS, Letarte M. Anti-angiogenic therapeutic strategies in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 2015;6:35.
67. Flieger D, Hainke S, Fischbach W. Dramatic improvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia after treatment with the vascular endothelial growth factor (VEGF) antagonist bevacizumab. *Ann Hematol.* 2006;85:631-2.
68. Mitchell A, Adams LA, MacQuillan G, Tibballs J, vanden Driesen R, Delriviere L. Bevacizumab reverses need for liver transplantation in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Liver Transpl.* 2008;14:210-3.
69. Dupuis-Girod S, Ginon I, Saurin JC, Marion D, Guillot E, Decullier E, et al. Bevacizumab in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and severe hepatic vascular malformations and high cardiac output. *JAMA.* 2012;307:948-55.
70. Oosting S, Nagengast W, de Vries E. More on bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 2009;361:931-2.
71. Lazaraki G, Akriviadis E, Pilpilidis I, Parisi I, Tzilves D, Tarpangos A. Low dose of bevacizumab is safe and effective in preventing bleeding episodes in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:2204-6.
72. Brinkerhoff BT, Choong NW, Treisman JS, Poetker DM. Intravenous and topical intranasal bevacizumab (Avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Otolaryngol.* 2012;33:349-51.
73. Fleagle JM, Bobba RK, Kardinal CG, Freter CE. Iron deficiency anemia related to hereditary hemorrhagic telangiectasia: response to treatment with bevacizumab. *Am J Med Sci.* 2012;343:249-51.
74. Follner S, Ibe M, Schreiber J. Bevacizumab treatment in hereditary hemorrhagic teleangiectasia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68:1685-6.
75. Lupu A, Stefanescu C, Treton X, Attar A, Corcos O, Bouhnik Y. Bevacizumab as rescue treatment for severe recurrent gastrointestinal bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:256-7.
76. Epperla N, Hocking W. Blessing for the bleeder: bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Clin Med Res.* 2015;13:32-5.
77. Iyer VN, Apala DR, Pannu BS, Kotecha A, Brinjikji W, Leise MD, et al. Intravenous Bevacizumab for Refractory Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-Related Epistaxis and Gastrointestinal Bleeding. *Mayo Clin Proc.* 2018;93:155-66.
78. Kim YH, Kim MJ, Choe SW, Sprecher D, Lee YJ, S PO. Selective effects of oral antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors on an animal model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Thromb Haemost.* 2017;15:1095-102.
79. Kovacs-Sipos E, Holzmann D, Scherer T, Soyka MB. Nintedanib as a novel treatment option in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *BMJ Case Rep.* 2017:219393.
80. Faughnan ME, Gossage JR, Chakinala MM, Oh SP, Kasthuri R, Hughes CCW, et al. Pazopanib may reduce bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Angiogenesis.* 2019;22:145-55.
81. Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J.* 2005;7:E14-9.
82. Lebrin F, Srun S, Raymond K, Martin S, van den Brink S, Freitas C, et al. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nat Med.* 2010;16:420-8.
83. Kurstin R. Using thalidomide in a patient with epithelioid leiomyosarcoma and Osler-Weber-Rendu disease. *Oncology (Williston Park).* 2002;16:21-4.
84. Perez-Encinas M, Rabunal Martinez MJ, Bello Lopez JL. Is thalidomide effective for the treatment of gastrointestinal bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia? *Haematologica.* 2002;87:ELT34.
85. Chen CH, Hsu HH, Hu RH, Lee PH, Ho CM. Long-term therapy with thalidomide in hereditary hemorrhagic telangiectasia: case report and literature review. *J Clin Pharmacol.* 2012;52:1436-40.

- 1 86. Franchini M, Frattini F, Crestani S, Bonfanti C. Novel treatments for epistaxis in hereditary  
2 hemorrhagic telangiectasia: a systematic review of the clinical experience with thalidomide. *J Thromb*  
3 *Thrombolysis*. 2013;36:355-7.
- 4 87. Hosman A, Westermann CJ, Snijder R, Disch F, Mummery CL, Mager JJ. Follow-up of Thalidomide  
5 treatment in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Rhinology*. 2015;53:340-4.
- 6 88. Invernizzi R, Quaglia F, Klersy C, Pagella F, Ornati F, Chu F, et al. Efficacy and safety of  
7 thalidomide for the treatment of severe recurrent epistaxis in hereditary haemorrhagic telangiectasia:  
8 results of a non-randomised, single-centre, phase 2 study. *Lancet Haematol*. 2015;2:e465-73.
- 9 89. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically  
10 important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*.  
11 2002;277:4883-91.
- 12 90. Zilberberg L, ten Dijke P, Sakai LY, Rifkin DB. A rapid and sensitive bioassay to measure bone  
13 morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biol*. 2007;8:41.
- 14 91. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, et al. FK506 activates BMP2,  
15 rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2013;123:3600-  
16 13.
- 17 92. Ruiz S, Chandakkar P, Zhao H, Papoin J, Chatterjee PK, Christen E, et al. Tacrolimus rescues the  
18 signaling and gene expression signature of endothelial ALK1 loss-of-function and improves HHT  
19 vascular pathology. *Hum Mol Genet*. 2017;26:4786-98.
- 20 93. Albinana V, Sanz-Rodriguez F, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM. Immunosuppressor  
21 FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming  
22 growth factor-beta1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharmacol*. 2011;79:833-43.
- 23 94. Gibson CC. Oral presentation at the 13th HHT International Conference, Rio Grande, Puerto Rico,  
24 USA. 2019.
- 25 95. Gibson CC, Zhu W, Davis CT, Bowman-Kirigin JA, Chan AC, Ling J, et al. Strategy for identifying  
26 repurposed drugs for the treatment of cerebral cavernous malformation. *Circulation*. 2015;131:289-99.
- 27 96. Skaro AI, Marotta PJ, McAlister VC. Regression of cutaneous and gastrointestinal telangiectasia  
28 with sirolimus and aspirin in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ann Intern Med*.  
29 2006;144:226-7.
- 30 97. Sommer N, Droege F, Gamen KE, Geisthoff U, Gall H, Tello K, et al. Treatment with low-dose  
31 tacrolimus inhibits bleeding complications in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and  
32 pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2019;9:2045894018805406.
- 33 98. Salloum R, Fox CE, Alvarez-Allende CR, Hammill AM, Dasgupta R, Dickie BH, et al. Response of  
34 Blue Rubber Bleb Nevus Syndrome to Sirolimus Treatment. *Pediatric blood & cancer*. 2016.
- 35 99. Yesil S, Tanyildiz HG, Bozkurt C, Cakmakci E, Sahin G. Single-center experience with sirolimus  
36 therapy for vascular malformations. *Pediatr Hematol Oncol*. 2016;33:219-25.
- 37 100. Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, Zimmers TA, et al. BMP9 and BMP10 are  
38 critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*. 2012;119:6162-71.
- 39 101. Laux DW, Young S, Donovan JP, Mansfield CJ, Upton PD, Roman BL. Circulating Bmp10 acts  
40 through endothelial Alk1 to mediate flow-dependent arterial quiescence. *Development*. 2013;140:3403-  
41 12.
- 42 102. Rostama B, Turner JE, Seavey GT, Norton CR, Gridley T, Vary CP, et al. DLL4/Notch1 and BMP9  
43 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27KIP1 and  
44 Thrombospondin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2626-37.
- 45 103. Ntumba K, Akla N, Oh SP, Eichmann A, Larrivee B. BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in  
46 mouse models of age-related macular degeneration. *Oncotarget*. 2016;7:55957-69.
- 47 104. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role  
48 of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*. 2008;111:633-42.
- 49 105. Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, et al. Pathogenesis of  
50 arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res*. 2010;106:1425-33.
- 51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



106. Tual-Chalot S, Mahmoud M, Allinson KR, Redgrave RE, Zhai Z, Oh SP, et al. Endothelial depletion of *Acvrl1* in mice leads to arteriovenous malformations associated with reduced endoglin expression. *PLoS One*. 2014;9:e98646.

107. Walcott BP. BMP signaling modulation attenuates cerebral arteriovenous malformation formation in a vertebrate model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34:1688-94.

108. Crist AM, Lee AR, Patel NR, Westhoff DE, Meadows SM. Vascular deficiency of *Smad4* causes arteriovenous malformations: a mouse model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Angiogenesis*. 2018;21:363-80.

109. Kim YH, Choe SW, Chae MY, Hong S, Oh SP. SMAD4 Deficiency Leads to Development of Arteriovenous Malformations in Neonatal and Adult Mice. *J Am Heart Assoc*. 2018;7:e009514.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Legends to the Figures

### Figure 1: Mutated genes in HHT and hPAH encode members of the BMP9/BMP10 signaling pathway.

The central cartoon depicts the BMP9/BMP10 signaling pathway in endothelial cells, from receptor binding at the cell surface to transcriptional effects in the nucleus. Subsequent steps implying phosphorylation of the type 1 receptor ALK1, phosphorylation of Smad 1/5/9 and translocation of the Smad complex to the nucleus are indicated by arrows. The right and left parts of the Figure list the names of the genes that are mutated in HHT and heritable PAH, respectively. The frequency of the mutations of each gene indicated in % in the parentheses.

### Figure 2: BMP9 induces vascular quiescence by various mechanism.

Through ALK1 phosphorylation of Smad1/5/9, BMP9 triggers transcriptional effects that induce vascular quiescence, including repression of ANGPT2 (angiopoietin 2) and induction of VEGFR1 expressions. In parallel, BMP9 inhibits the phosphorylation of the phosphatase PTEN (which is active in its unphosphorylated form), thereby inhibiting the activity of PI3K, a downstream effector of both VEGF and ANGPT2.

ANGPT2 signaling is complex : when ANGPT1 (angiopoietin 1) is present, ANGPT2 acts as an antagonist of ANGPT1 and prevents the phosphorylation of the Tie2 receptor and the activation of PI3K. When ANGPT2 is present in large excess over ANGPT1, it acts as an agonist of the Tie2 receptor and stimulates PI3 Kinase.

VEGF activates different signaling pathways (PI3K/AKT, PLC $\gamma$ /ERK, src/p38MAPK) which trigger a variety of biological responses (EC (endothelial cell) survival, permeability, proliferation and migration). VEGFR1, whose expression is increased by BMP9, acts as a decoy VEGF receptor, thereby shutting down the pro-angiogenic VEGF signaling mediated by VEGFR2.

Altogether, BMP9 maintains vascular quiescence by shutting down the pro-angiogenic VEGF and ANGPT2 signaling pathways.

### Figure 3: Current etiological treatments for HHT.

The HHT-causing mutations of genes encoding components of the BMP9/BMP10 signaling pathway (indicated by red asterisks), result in decreased downstream signaling and increased activity of the VEGF and ANGPT2 signaling pathways. Several drugs that target these pathways are already in use in clinical trials (blue boxes) or under evaluation in preclinical studies (parma boxes) for HHT treatment. Currently used HHT treatments target VEGF via anti-VEGF antibodies (bevacizumab) or VEGFR2 tyrosine kinase inhibitors (pazopanib). Tacrolimus and sirolimus were identified through recent high-throughput screening of FDA-approved drugs as activators of ALK1 (and ALK3) signaling. They are under phase I/II trials as clinical treatments for HHT. Preclinical studies are investigating the beneficial effects of anti-ANGPT2 antibodies (LC-10) and PI3-kinase inhibitors (wortmannin or LY294002). As shown on this cartoon, all these treatments aim at reequilibrating the balance between the BMP9 pathway and the VEGF/ANGPT2 pathways in order to re-establish vascular quiescence.

Figure 1

[Click here to access/download;Figure;Fig 1-Robert.pptx](#)

# HHT (mutated genes)

# heritable PAH (mutated genes)

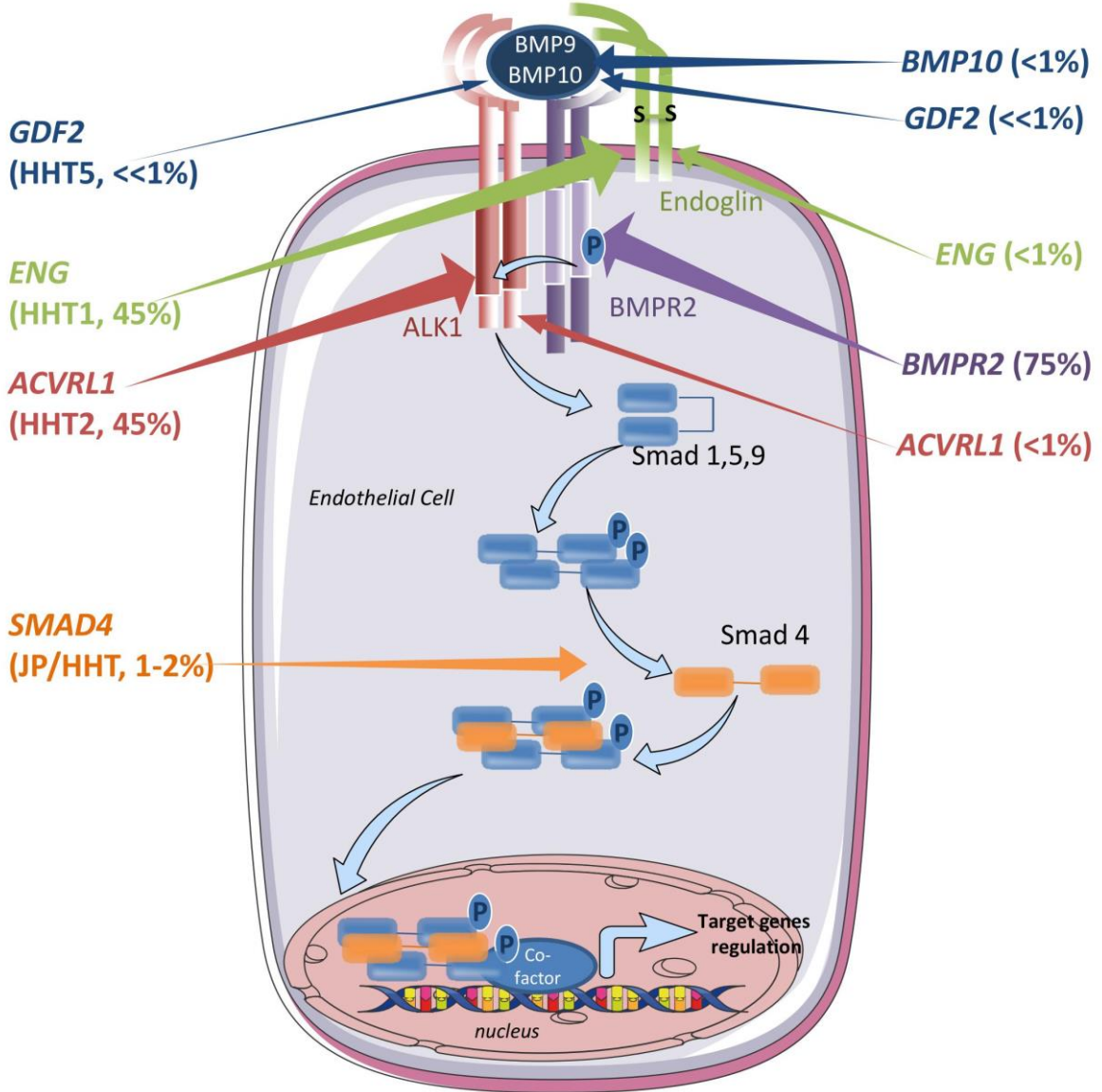


Figure 2

[Click here to access/download;Figure;Fig 2-Robert.pptx](#)

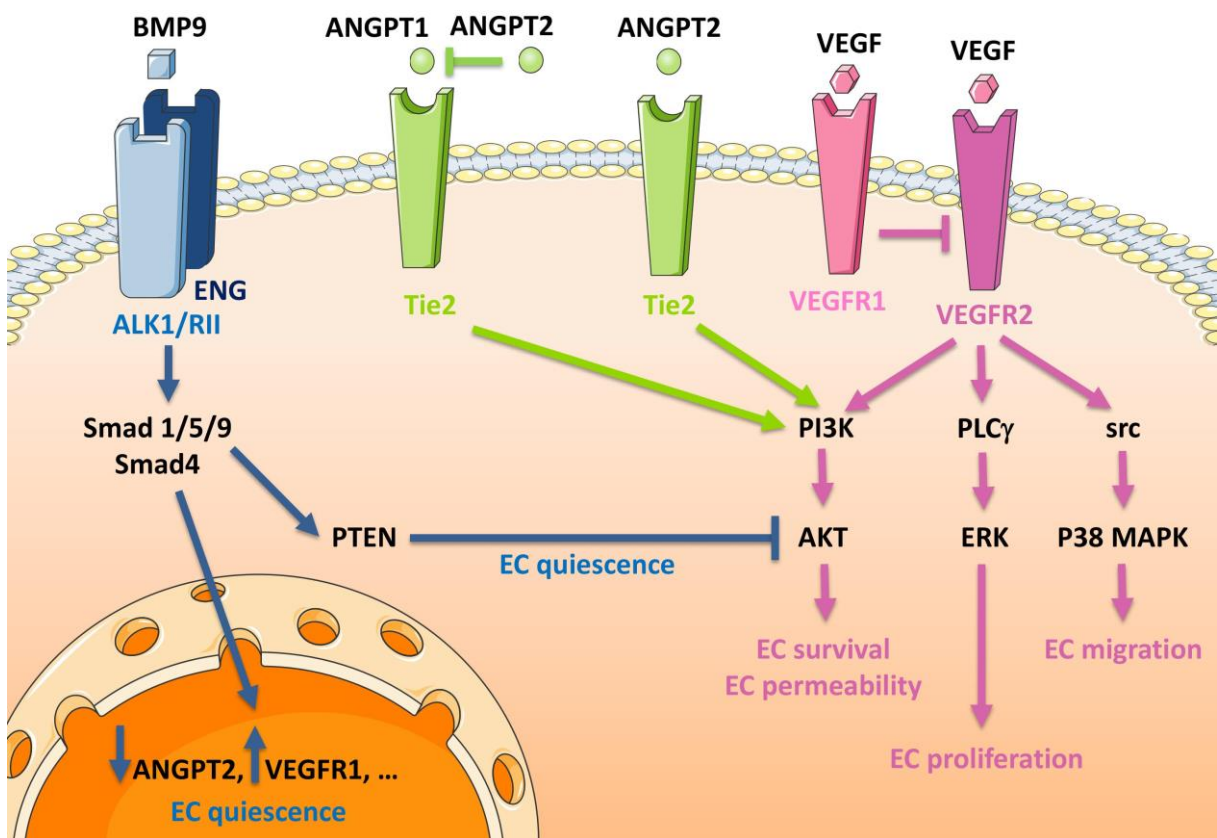
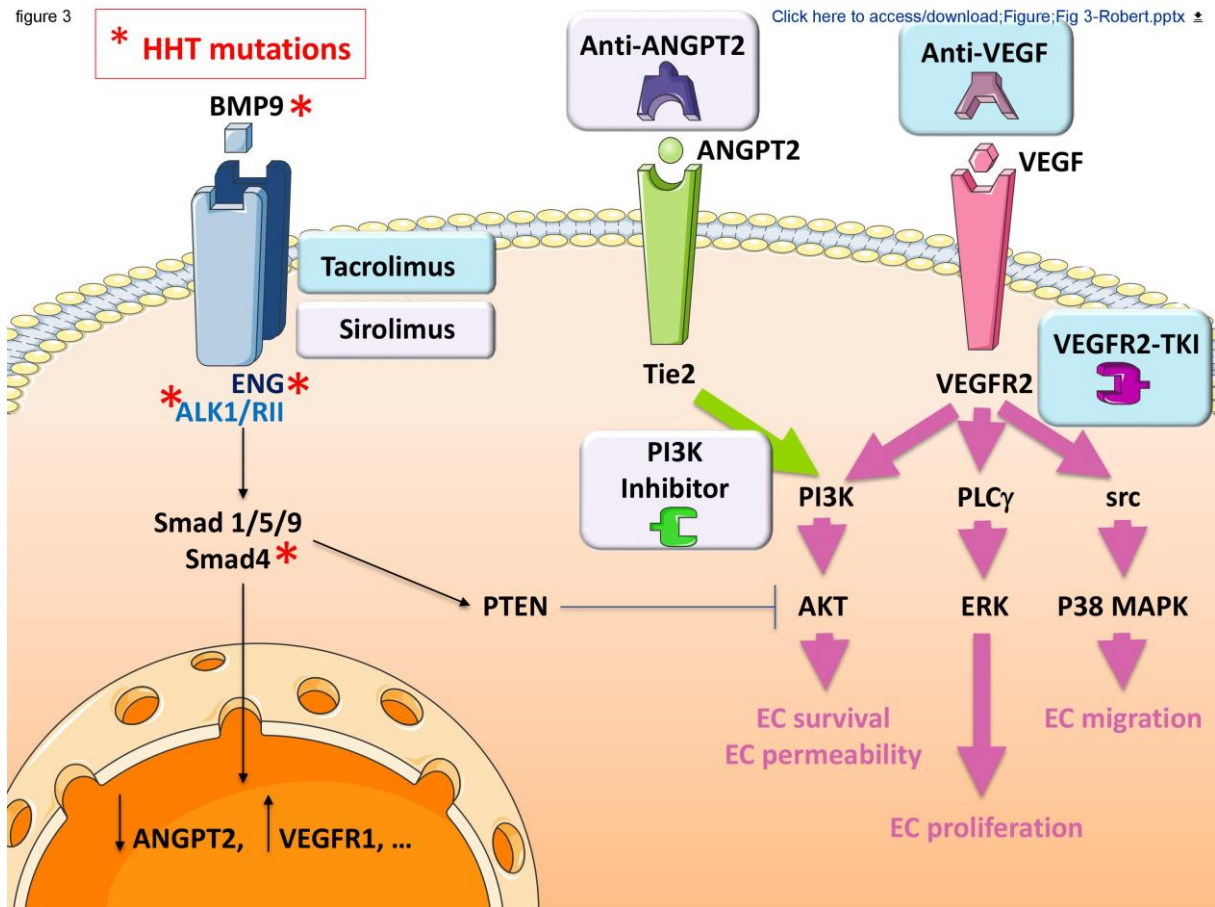


figure 3



[Click here to access/download;Figure;Fig 3-Robert.pptx](#)

## Références bibliographiques

- Abdalla, S. A., C. J. Gallione, R. J. Barst, E. M. Horn, J. A. Knowles, D. A. Marchuk, M. Letarte, et J. H. Morse.** « Primary Pulmonary Hypertension in Families with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *The European Respiratory Journal* 23, n° 3 (mars 2004): 373-77. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00085504>.
- Al-Samkari, H., A. Kritharis, J. M. Rodriguez-Lopez, et D. J. Kuter.** « Systemic Bevacizumab for the Treatment of Chronic Bleeding in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Internal Medicine* 285, n° 2 (février 2019): 223-31. <https://doi.org/10.1111/joim.12832>.
- Antigny, Fabrice, Aurélie Hautefort, Jolyane Meloche, Milia Belacel-Ouari, Boris Manoury, Catherine Rucker-Martin, Christine Péchoux, et al.** « Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 133, n° 14 (5 avril 2016): 1371-85. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951>.
- Ardelean, Daniela S., et Michelle Letarte.** « Anti-Angiogenic Therapeutic Strategies in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Frontiers in Genetics* 6 (2015): 35. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00035>.
- Arthur, H. M., J. Ure, A. J. Smith, G. Renforth, D. I. Wilson, E. Torsney, R. Charlton, et al.** « Endoglin, an Ancillary TGFbeta Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development ». *Developmental Biology* 217, n° 1 (1 janvier 2000): 42-53. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9534>.
- Asaki, Tetsuo, Keiichi Kuwano, Keith Morrison, John Gatfield, Taisuke Hamamoto, et Martine Clozel.** « Selexipag: An Oral and Selective IP Prostacyclin Receptor Agonist for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58, n° 18 (24 septembre 2015): 7128-37. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00698>.
- Babitt, Jodie L., Ying Zhang, Tarek A. Samad, Yin Xia, Jie Tang, Jason A. Campagna, Alan L. Schneyer, Clifford J. Woolf, et Herbert Y. Lin.** « Repulsive Guidance Molecule (RGMa), a DRAGON Homologue, Is a Bone Morphogenetic Protein Co-Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 33 (19 août 2005): 29820-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503511200>.
- Barratt M.J and Frail D.E** « Drug Repositioning: Bringing New Life to Shelved Assets and Existing Drugs. ». *ChemMedChem* 8, n° 2 (2013): 336-37. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200552>.
- Barette, Caroline, Emmanuelle Soleilhac, Céline Charavay, Claude Cochet, et Marie-Odile Fauvarque.** « [Strength and specificity of the CMBA screening platform for bioactive molecules discovery] ». *Medicine Sciences: M/S* 31, n° 4 (avril 2015): 423-31. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104017>.
- Barst, R. J., L. J. Rubin, W. A. Long, M. D. McGoon, S. Rich, D. B. Badesch, B. M. Groves, et al.** « A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 334, n° 5 (1 février 1996): 296-301. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340504>.

- Beppu, Hideyuki, Fumito Ichinose, Noriko Kawai, Rosemary C. Jones, Paul B. Yu, Warren M. Zapol, Kohei Miyazono, En Li, et Kenneth D. Bloch.** « BMPR-II Heterozygous Mice Have Mild Pulmonary Hypertension and an Impaired Pulmonary Vascular Remodeling Response to Prolonged Hypoxia ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287, n° 6 (décembre 2004): L1241-1247. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00239.2004>.
- Bidart, Marie, Nicolas Ricard, Sandrine Levet, Michel Samson, Christine Mallet, Laurent David, Mariela Subileau, Emmanuelle Tillet, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « BMP9 Is Produced by Hepatocytes and Circulates Mainly in an Active Mature Form Complexed to Its Prodomain ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69, n° 2 (janvier 2012): 313-24. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0751-1>.
- Bittker, Joshua A.** « High-Throughput RT-PCR for Small-Molecule Screening Assays ». *Current Protocols in Chemical Biology* 4, n° 1 (1 mars 2012): 49-63. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110204>.
- Boscolo, Elisa, et Joyce Bischoff.** « Vasculogenesis in Infantile Hemangioma ». *Angiogenesis* 12, n° 2 (2009): 197-207. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9148-2>.
- Bostrom, M. P., J. M. Lane, W. S. Berberian, A. A. Missri, E. Tomin, A. Weiland, S. B. Doty, D. Glaser, et V. M. Rosen.** « Immunolocalization and Expression of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Fracture Healing ». *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 13, n° 3 (mai 1995): 357-67. <https://doi.org/10.1002/jor.1100130309>.
- Bourdeau, A., D. J. Dumont, et M. Letarte.** « A Murine Model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The Journal of Clinical Investigation* 104, n° 10 (novembre 1999): 1343-51. <https://doi.org/10.1172/JCI8088>.
- Bowden, Gregory D., Kirkwood M. Land, Roberta M. O'Connor, et Heather M. Fritz.** « High-throughput screen of drug repurposing library identifies inhibitors of Sarcocystis neurona growth ». *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 8, n° 1 (1 avril 2018): 137-44. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.02.002>.
- Bragdon, Beth, Oleksandra Moseychuk, Sven Saldanha, Daniel King, Joanne Julian, et Anja Nohe.** « Bone Morphogenetic Proteins: A Critical Review ». *Cellular Signalling* 23, n° 4 (avril 2011): 609-20. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>.
- Brazil, Derek P., Rachel H. Church, Satnam Surrae, Catherine Godson, et Finian Martin.** « BMP Signalling: Agony and Antagonism in the Family ». *Trends in Cell Biology* 25, n° 5 (mai 2015): 249-64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.004>.
- Brinkerhoff, Brian T., Nicholas W. Choong, Jonathan S. Treisman, et David M. Poetker.** « Intravenous and Topical Intranasal Bevacizumab (Avastin) in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *American Journal of Otolaryngology* 33, n° 3 (juin 2012): 349-51. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2011.07.012>.
- Brown, Monica A., Qinghai Zhao, Kent A. Baker, Chethana Naik, Cecil Chen, Laurie Pukac, Mallika Singh, et al.** « Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with pro-Region and Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 26 (1 juillet 2005): 25111-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503328200>.

- Brunet, Guy, Gaëtan Lesca, Emmanuelle Génin, Sophie Dupuis-Girod, Alain Bideau, et Henri Plauchu.** « Trente ans d'étude de la maladie de Rendu-Osler en France : démographie historique, génétique des populations et biologie moléculaire ». *Population* Vol. 64, n° 2 (2009): 305-25.
- Cai, Jie, Evangelia Pardali, Gonzalo Sánchez-Duffhues, et Peter ten Dijke.** « BMP Signaling in Vascular Diseases ». *FEBS Letters* 586, n° 14 (4 juillet 2012): 1993-2002. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.030>.
- Castonguay, Roselyne, Eric D. Werner, Robert G. Matthews, Eleonora Presman, Aaron W. Mulivor, Nicolas Solban, Dianne Sako, et al.** « Soluble Endoglin Specifically Binds Bone Morphogenetic Proteins 9 and 10 via Its Orphan Domain, Inhibits Blood Vessel Formation, and Suppresses Tumor Growth ». *The Journal of Biological Chemistry* 286, n° 34 (26 août 2011): 30034-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260133>.
- Celeste, A. J., J. A. Iannazzi, R. C. Taylor, R. M. Hewick, V. Rosen, E. A. Wang, et J. M. Wozney.** « Identification of Transforming Growth Factor Beta Family Members Present in Bone-Inductive Protein Purified from Bovine Bone ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, n° 24 (décembre 1990): 9843-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9843>.
- Chen, Chih-Hsuan, Hsao-Hsun Hsu, Rey-Heng Hu, Po-Huang Lee, et Cheng-Maw Ho.** « Long-Term Therapy with Thalidomide in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Case Report and Literature Review ». *Journal of Clinical Pharmacology* 52, n° 9 (septembre 2012): 1436-40. <https://doi.org/10.1177/0091270011417824>.
- Chen, Hanying, Shu Shi, Lourdes Acosta, Weiming Li, Jonathan Lu, Shideng Bao, Zhuang Chen, et al.** « BMP10 Is Essential for Maintaining Cardiac Growth during Murine Cardiogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 131, n° 9 (mai 2004): 2219-31. <https://doi.org/10.1242/dev.01094>.
- Chen, Hao, John Brady Ridgway, Tao Sai, Joyce Lai, Søren Warming, Hanying Chen, Merone Roose-Girma, Gu Zhang, Weinian Shou, et Minhong Yan.** « Context-Dependent Signaling Defines Roles of BMP9 and BMP10 in Embryonic and Postnatal Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, n° 29 (16 juillet 2013): 11887-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306074110>.
- Chen, X., A. Zankl, F. Niroomand, Z. Liu, H. A. Katus, L. Jahn, et C. Tiefenbacher.** « Upregulation of ID Protein by Growth and Differentiation Factor 5 (GDF5) through a Smad-Dependent and MAPK-Independent Pathway in HUVMC ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41, n° 1 (juillet 2006): 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.03.421>.
- Chilvers, E. R., M. K. Whyte, J. E. Jackson, D. J. Allison, et J. M. Hughes.** « Effect of Percutaneous Transcatheter Embolization on Pulmonary Function, Right-to-Left Shunt, and Arterial Oxygenation in Patients with Pulmonary Arteriovenous Malformations ». *The American Review of Respiratory Disease* 142, n° 2 (août 1990): 420-25. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.2.420>.



- Coleman, R. A., W. L. Smith, et S. Narumiya.** « International Union of Pharmacology Classification of Prostanoid Receptors: Properties, Distribution, and Structure of the Receptors and Their Subtypes ». *Pharmacological Reviews* 46, n° 2 (juin 1994): 205-29.
- Colombo, Realdo** (1510?-1559) Auteur du texte. *De re anatomica libri XV ([Reprod.]*), 1559. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k605953>.
- Coussens, Nathan P, John C Braisted, Tyler Peryea, G Sitta Sittampalam, Anton Simeonov, et Matthew D Hall.** « Small-Molecule Screens: A Gateway to Cancer Therapeutic Agents with Case Studies of Food and Drug Administration-Approved Drugs ». *Pharmacological reviews* 69, n° 4 (octobre 2017): 479-96. <https://doi.org/10.1124/pr.117.013755>.
- Cunha, Sara I., Evangelia Pardali, Midory Thorikay, Charlotte Anderberg, Lukas Hawinkels, Marie-José Goumans, Jasbir Sehra, Carl-Henrik Heldin, Peter ten Dijke, et Kristian Pietras.** « Genetic and Pharmacological Targeting of Activin Receptor-like Kinase 1 Impairs Tumor Growth and Angiogenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 207, n° 1 (18 janvier 2010): 85-100. <https://doi.org/10.1084/jem.20091309>.
- David, Laurent, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « Emerging Role of Bone Morphogenetic Proteins in Angiogenesis ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, n° 3 (juin 2009): 203-12. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.05.001>.
- David, Laurent, Christine Mallet, Michelle Keramidas, Noël Lamandé, Jean-Marie Gasc, Sophie Dupuis-Girod, Henri Plauchu, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Circulating Vascular Quiescence Factor ». *Circulation Research* 102, n° 8 (25 avril 2008): 914-22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165530>.
- David, Laurent, Christine Mallet, Sabine Mazerbourg, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « Identification of BMP9 and BMP10 as Functional Activators of the Orphan Activin Receptor-like Kinase 1 (ALK1) in Endothelial Cells ». *Blood* 109, n° 5 (1 mars 2007): 1953-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-034124>.
- Davie, Neil, Stephen J. Haleen, Paul D. Upton, Julia M. Polak, Magdi H. Yacoub, Nicholas W. Morrell, et John Wharton.** « 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, n° 3 (1 février 2002): 398-405. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.3.2104059>.
- Deng, Zemin, Jane H. Morse, Susan L. Slager, Nieves Cuervo, Keith J. Moore, George Venetos, Sergey Kalachikov, et al.** « Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene ». *American Journal of Human Genetics* 67, n° 3 (septembre 2000): 737-44.
- Derynck, Rik, et Ying E. Zhang.** « Smad-Dependent and Smad-Independent Pathways in TGF-Beta Family Signalling ». *Nature* 425, n° 6958 (9 octobre 2003): 577-84. <https://doi.org/10.1038/nature02006>.
- Domp Martin, A., M. Vikkula, et L. M. Boon.** « Venous Malformation: Update on Aetiopathogenesis, Diagnosis and Management ». *Phlebology* 25, n° 5 (octobre 2010): 224-35. <https://doi.org/10.1258/phleb.2009.009041>.
- Dunmore, Benjamin J., Kylie M. Drake, Paul D. Upton, Mark R. Toshner, Micheala A. Aldred, et Nicholas W. Morrell.** « The Lysosomal Inhibitor, Chloroquine, Increases Cell Surface BMPR-II

Levels and Restores BMP9 Signalling in Endothelial Cells Harboursing BMPRII Mutations ». *Human Molecular Genetics* 22, n° 18 (15 septembre 2013): 3667-79. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt216>.

**Dupuis-Girod, Sophie, Anne-Laure Chesnais, Isabelle Ginon, Jérôme Dumortier, Jean-Christophe Saurin, Gérard Finet, Evelyne Decullier, Denis Marion, Henri Plauchu, et Olivier Boillot.** « Long-Term Outcome of Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Severe Hepatic Involvement after Orthotopic Liver Transplantation: A Single-Center Study ». *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 16, n° 3 (mars 2010): 340-47. <https://doi.org/10.1002/lt.21990>.

**Dupuis-Girod, Sophie, Isabelle Ginon, Jean-Christophe Saurin, Denis Marion, Elsa Guillot, Evelyne Decullier, Adeline Roux, et al.** « Bevacizumab in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Severe Hepatic Vascular Malformations and High Cardiac Output ». *JAMA* 307, n° 9 (7 mars 2012): 948-55. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.250>.

**Dutton, J. A., J. E. Jackson, J. M. Hughes, M. K. Whyte, A. M. Peters, W. Ussov, et D. J. Allison.** « Pulmonary Arteriovenous Malformations: Results of Treatment with Coil Embolization in 53 Patients ». *AJR. American Journal of Roentgenology* 165, n° 5 (novembre 1995): 1119-25. <https://doi.org/10.2214/ajr.165.5.7572487>.

**Ebisawa, T., K. Tada, I. Kitajima, K. Tojo, T. K. Sampath, M. Kawabata, K. Miyazono, et T. Imamura.** « Characterization of Bone Morphogenetic Protein-6 Signaling Pathways in Osteoblast Differentiation ». *Journal of Cell Science* 112 ( Pt 20) (octobre 1999): 3519-27.

**Eerola, Iiro, Laurence M. Boon, John B. Mulliken, Patricia E. Burrows, Anne Domp Martin, Shoji Watanabe, Romain Vanwijck, et Miikka Vakkula.** « Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation, a New Clinical and Genetic Disorder Caused by RASA1 Mutations ». *American Journal of Human Genetics* 73, n° 6 (décembre 2003): 1240-49. <https://doi.org/10.1086/379793>.

**Elvers, Margitta, Annika Herrmann, Peter Seizer, Patrick Münzer, Sandra Beck, Tanja Schönberger, Oliver Borst, et al.** « Intracellular cyclophilin A is an important Ca<sup>2+</sup> regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation ». *Blood* 120, n° 6 (9 août 2012): 1317. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-398438>.

**Epperla, Narendranath, et William Hocking.** « Blessing for the Bleeder: Bevacizumab in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Clinical Medicine & Research* 13, n° 1 (mars 2015): 32-35. <https://doi.org/10.3121/cmr.2013.1205>.

**Faughnan, M. E., V. A. Palda, G. Garcia-Tsao, U. W. Geisthoff, J. McDonald, D. D. Proctor, J. Spears, et al.** « International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Medical Genetics* 48, n° 2 (février 2011): 73-87. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.069013>.

**Faughnan, Marie E., James R. Gossage, Murali M. Chakinala, S. Paul Oh, Raj Kasthuri, Christopher C. W. Hughes, Justin P. McWilliams, et al.** « Pazopanib May Reduce Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Angiogenesis* 22, n° 1 (février 2019): 145-55. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9646-1>.

- Fleagle, Jessica M., Ravi K. Bobba, Carl G. Kardinal, et Carl E. Freter.** « Iron Deficiency Anemia Related to Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Response to Treatment with Bevacizumab ». *The American Journal of the Medical Sciences* 343, n° 3 (mars 2012): 249-51. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182429866>.
- Flieger, Dimitri, Sabine Hainke, et Wolfgang Fischbach.** « Dramatic Improvement in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia after Treatment with the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Antagonist Bevacizumab ». *Annals of Hematology* 85, n° 9 (septembre 2006): 631-32. <https://doi.org/10.1007/s00277-006-0147-8>.
- Fodstad, Philip, Sinan Dheyauldeen, Marit Rinde, et Gregor Bachmann-Harildstad.** « Anti-VEGF with 3-Week Intervals Is Effective on Anemia in a Patient with Severe Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Annals of Hematology* 90, n° 5 (mai 2011): 611-12. <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1063-5>.
- Föllner, Sebastian, Michael Ibe, et Jens Schreiber.** « Bevacizumab Treatment in Hereditary Hemorrhagic Teleangiectasia ». *European Journal of Clinical Pharmacology* 68, n° 12 (décembre 2012): 1685-86. <https://doi.org/10.1007/s00228-012-1308-4>.
- Franchini, Massimo, Francesco Frattini, Silvia Crestani, et Carlo Bonfanti.** « Novel Treatments for Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Systematic Review of the Clinical Experience with Thalidomide ». *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 36, n° 3 (octobre 2013): 355-57. <https://doi.org/10.1007/s11239-012-0840-5>.
- Fruttiger, Marcus.** « Development of the Retinal Vasculature ». *Angiogenesis* 10, n° 2 (2007): 77-88. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9065-1>.
- Fujiwara, Maya, Hisato Yagi, Rumiko Matsuoka, Kaoru Akimoto, Michiko Furutani, Shin-ichiro Imamura, Ritei Uehara, et al.** « Implications of Mutations of Activin Receptor-like Kinase 1 Gene (ALK1) in Addition to Bone Morphogenetic Protein Receptor II Gene (BMP2) in Children with Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 72, n° 1 (janvier 2008): 127-33. <https://doi.org/10.1253/circj.72.127>.
- Gaillard, S., S. Dupuis-Girod, F. Boutitie, S. Rivière, S. Morinière, P.-Y. Hatron, G. Manfredi, et al.** « Tranexamic Acid for Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Patients: A European Cross-over Controlled Trial in a Rare Disease ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 12, n° 9 (septembre 2014): 1494-1502. <https://doi.org/10.1111/jth.12654>.
- Jong, D. S. de, W. T. Steegenga, J. M. A. Hendriks, E. J. J. van Zoelen, W. Olijve, et K. J. Dechering.** « Regulation of Notch Signaling Genes during BMP2-Induced Differentiation of Osteoblast Precursor Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, n° 1 (16 juillet 2004): 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.150>.
- Jong, Diana S. de, Bart L. T. Vaes, Koen J. Dechering, Alie Feijen, Jose M. A. Hendriks, Ron Wehrens, Christine L. Mummery, Everardus J. J. van Zoelen, Wiebe Olijve, et Wilma T. Steegenga.** « Identification of Novel Regulators Associated with Early-Phase Osteoblast Differentiation ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19, n° 6 (juin 2004): 947-58. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040216>.

- Galien** (0131?-0201?), Claude. *De l'utilité des parties du corps humain*. Consulté le 30 août 2019. [https://data.bnf.fr/fr/12512447/claude\\_galien\\_de\\_l\\_utilite\\_des\\_parties\\_du\\_corps\\_humain/](https://data.bnf.fr/fr/12512447/claude_galien_de_l_utilite_des_parties_du_corps_humain/).
- Galié, Nazzareno, David Badesch, Ronald Oudiz, Gérald Simonneau, Michael D. McGoon, Anne M. Keogh, Adaani E. Frost, et al.** « Ambrisentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 46, n° 3 (2 août 2005): 529-35. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.050>.
- Galiè, Nazzareno, Bruce H. Brundage, Hossein A. Ghofrani, Ronald J. Oudiz, Gerald Simonneau, Zeenat Safdar, Shelley Shapiro, et al.** « Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 119, n° 22 (9 juin 2009): 2894-2903. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839274>.
- Galiè, Nazzareno, Hossein A. Ghofrani, Adam Torbicki, Robyn J. Barst, Lewis J. Rubin, David Badesch, Thomas Fleming, et al.** « Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 353, n° 20 (17 novembre 2005): 2148-57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050010>.
- Galiè, Nazzareno, Horst Olschewski, Ronald J. Oudiz, Fernando Torres, Adaani Frost, Hossein A. Ghofrani, David B. Badesch, et al.** « 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, n° 23 (10 juin 2008): 3010-19. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510>.
- García-Martín, Estela, SAGRARIO Pernía-López, Pilar A. Martínez-Ortega, Beatriz Monje, Cristina Ruiz-Martínez, et María Sanjurjo-Saez.** « Intranasal Bevacizumab Treatment on Epistaxis in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: A Case Report ». *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice* 26, n° 4 (juillet 2019): 226-28. <https://doi.org/10.1136/ejhpharm-2017-001293>.
- Ghofrani, Hossein-Ardeschir, Nazzareno Galiè, Friedrich Grimminger, Ekkehard Grünig, Marc Humbert, Zhi-Cheng Jing, Anne M. Keogh, et al.** « Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 369, n° 4 (25 juillet 2013): 330-40. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209655>.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, et D. J. Stewart.** « Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 328, n° 24 (17 juin 1993): 1732-39. <https://doi.org/10.1056/NEJM199306173282402>.
- Gibson, Christopher C., Weiquan Zhu, Chadwick T. Davis, Jay A. Bowman-Kirigin, Aubrey C. Chan, Jing Ling, Ashley E. Walker, et al.** « Strategy for Identifying Repurposed Drugs for the Treatment of Cerebral Cavernous Malformation ». *Circulation* 131, n° 3 (20 janvier 2015): 289-99. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010403>.
- Gomez-Arroyo, Jose G., Laszlo Farkas, Aysar A. Alhussaini, Daniela Farkas, Donatas Kraskauskas, Norbert F. Voelkel, et Harm J. Bogaard.** « The Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension in Perspective ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 302, n° 4 (15 février 2012): L363-369. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00212.2011>.

- Govani, Fatima S., et Claire L. Shovlin.** « Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: A Clinical and Scientific Review ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 17, n° 7 (juillet 2009): 860-71. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.35>.
- Grewal, Thomas, Rachael Evans, Carles Rentero, Francesc Tebar, Laia Cubells, Iñaki de Diego, Matthias F. Kirchhoff, et al.** « Annexin A6 Stimulates the Membrane Recruitment of P120GAP to Modulate Ras and Raf-1 Activity ». *Oncogene* 24, n° 38 (1 septembre 2005): 5809-20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208743>.
- Guignabert, Christophe, Ly Tu, Barbara Girerd, Nicolas Ricard, Alice Huertas, David Montani, et Marc Humbert.** « New Molecular Targets of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension: Importance of Endothelial Communication ». *Chest* 147, n° 2 (février 2015): 529-37. <https://doi.org/10.1378/chest.14-0862>.
- Gupta, P., C. Mordin, J. Curtis, J. M. B. Hughes, C. L. Shovlin, et J. E. Jackson.** « Pulmonary Arteriovenous Malformations: Effect of Embolization on Right-to-Left Shunt, Hypoxemia, and Exercise Tolerance in 66 Patients ». *AJR. American Journal of Roentgenology* 179, n° 2 (août 2002): 347-55. <https://doi.org/10.2214/ajr.179.2.1790347>.
- Hall, B. K.** « Earliest Evidence of Cartilage and Bone Development in Embryonic Life ». *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n° 225 (décembre 1987): 255-72.
- Harrison, R. E., J. A. Flanagan, M. Sankelo, S. A. Abdalla, J. Rowell, R. D. Machado, C. G. Elliott, et al.** « Molecular and Functional Analysis Identifies ALK-1 as the Predominant Cause of Pulmonary Hypertension Related to Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Medical Genetics* 40, n° 12 (décembre 2003): 865-71. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.865>.
- Harrison, Rachel E., Rolf Berger, Sheila G. Haworth, Robert Tulloh, Christoph J. Mache, Nicholas W. Morrell, Micheala A. Aldred, et Richard C. Trembath.** « Transforming Growth Factor-Beta Receptor Mutations and Pulmonary Arterial Hypertension in Childhood ». *Circulation* 111, n° 4 (1 février 2005): 435-41. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000153798.78540.87>.
- Harvey, William, et Chauncey Depew Leake.** *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus.* Springfield, Ill. : Thomas, 1928. <http://archive.org/details/exercitatioanato00harv>.
- Heinke, Jennifer, Leonie Wehofsits, Qian Zhou, Christoph Zoeller, Kim-Miriam Baar, Thomas Helbing, Anna Laib, et al.** « BMPER Is an Endothelial Cell Regulator and Controls Bone Morphogenetic Protein-4-Dependent Angiogenesis ». *Circulation Research* 103, n° 8 (10 octobre 2008): 804-12. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178434>.
- Hirata, Y., T. Emori, S. Eguchi, K. Kanno, T. Imai, K. Ohta, et F. Marumo.** « Endothelin Receptor Subtype B Mediates Synthesis of Nitric Oxide by Cultured Bovine Endothelial Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 91, n° 4 (avril 1993): 1367-73. <https://doi.org/10.1172/JCI116338>.
- Hong, Kwon-Ho, Young Jae Lee, Eunji Lee, Sung Ok Park, Chul Han, Hideyuki Beppu, En Li, Mohan K. Raizada, Kenneth D. Bloch, et S. Paul Oh.** « Genetic Ablation of the BMPR2 Gene in Pulmonary Endothelium Is Sufficient to Predispose to Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 118, n° 7 (12 août 2008): 722-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.736801>.

- Hosman, A., C. J. J. Westermann, R. Snijder, F. Disch, C. L. Mummery, et J. J. Mager.** « Follow-up of Thalidomide Treatment in Patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *Rhinology* 53, n° 4 (décembre 2015): 340-44. <https://doi.org/10.4193/Rhin14.289>.
- Huang, Jianhe, John Elicker, Nina Bowens, Xi Liu, Lan Cheng, Thomas P. Cappola, Xiaohong Zhu, et Michael S. Parmacek.** « Myocardin Regulates BMP10 Expression and Is Required for Heart Development ». *The Journal of Clinical Investigation* 122, n° 10 (octobre 2012): 3678-91. <https://doi.org/10.1172/JCI63635>.
- Humbert, M., R. J. Barst, I. M. Robbins, R. N. Channick, N. Galiè, A. Boonstra, L. J. Rubin, E. M. Horn, A. Manes, et G. Simonneau.** « Combination of Bosentan with Epoprostenol in Pulmonary Arterial Hypertension: BREATHE-2 ». *The European Respiratory Journal* 24, n° 3 (septembre 2004): 353-59. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00028404>.
- Humbert, M., G. Monti, F. Brenot, O. Sitbon, A. Portier, L. Grangeot-Keros, P. Duroux, P. Galanaud, G. Simonneau, et D. Emilie.** « Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151, n° 5 (mai 1995): 1628-31. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735624>.
- Humbert, Marc, J. Gerry Coghlan, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Friedrich Grimminger, Jian-Guo He, Gabriela Riemekasten, Carmine Dario Vizza, et al.** « Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Connective Tissue Disease: Results from PATENT-1 and PATENT-2 ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76, n° 2 (février 2017): 422-26. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-209087>.
- Humbert, Marc, Edmund M. T. Lau, David Montani, Xavier Jaïs, Oliver Sitbon, et Gérald Simonneau.** « Advances in Therapeutic Interventions for Patients with Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 130, n° 24 (9 décembre 2014): 2189-2208. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006974>.
- Humbert, Marc, Nicholas W Morrell, Stephen L Archer, Kurt R Stenmark, Margaret R MacLean, Irene M Lang, Brian W Christman, et al.** « Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 43, n° 12, Supplement (16 juin 2004): S13-24. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.029>.
- Iglarz, Marc, Christoph Binkert, Keith Morrison, Walter Fischli, John Gatfield, Alexander Treiber, Thomas Weller, et al.** « Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, n° 3 (décembre 2008): 736-45. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.142976>.
- Invernizzi, Rosangela, Federica Quaglia, Catherine Klersy, Fabio Pagella, Federica Ornati, Francesco Chu, Elina Matti, et al.** « Efficacy and Safety of Thalidomide for the Treatment of Severe Recurrent Epistaxis in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: Results of a Non-Randomised, Single-Centre, Phase 2 Study ». *The Lancet. Haematology* 2, n° 11 (novembre 2015): e465-473. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(15\)00195-7](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(15)00195-7).
- Ishida, W., T. Hamamoto, K. Kusanagi, K. Yagi, M. Kawabata, K. Takehara, T. K. Sampath, M. Kato, et K. Miyazono.** « Smad6 Is a Smad1/5-Induced Smad Inhibitor. Characterization of Bone Morphogenetic Protein-Responsive Element in the Mouse Smad6 Promoter ». *The Journal of*

*Biological Chemistry* 275, n° 9 (3 mars 2000): 6075-79.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6075>.

- Iyer, Vivek N., Dinesh R. Apala, Bibek S. Pannu, Aditya Kotecha, Waleed Brinjikji, Michael D. Leise, Patrick S. Kamath, et al.** « Intravenous Bevacizumab for Refractory Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia-Related Epistaxis and Gastrointestinal Bleeding ». *Mayo Clinic Proceedings* 93, n° 2 (2018): 155-66. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.11.013>.
- Jing, Zhi-Cheng, Keyur Parikh, Tomas Pulido, Carlos Jerjes-Sanchez, R. James White, Roblee Allen, Adam Torbicki, et al.** « Efficacy and Safety of Oral Treprostinil Monotherapy for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A Randomized, Controlled Trial ». *Circulation* 127, n° 5 (5 février 2013): 624-33. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.124388>.
- Johnson, D. W., J. N. Berg, M. A. Baldwin, C. J. Gallione, I. Marondel, S. J. Yoon, T. T. Stenzel, et al.** « Mutations in the Activin Receptor-like Kinase 1 Gene in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia Type 2 ». *Nature Genetics* 13, n° 2 (juin 1996): 189-95. <https://doi.org/10.1038/ng0696-189>.
- Kameda, T., C. Koike, K. Saitoh, A. Kuroiwa, et H. Iba.** « Developmental Patterning in Chondrocytic Cultures by Morphogenic Gradients: BMP Induces Expression of Indian Hedgehog and Noggin ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 4, n° 3 (mars 1999): 175-84.
- Katagiri, Takenobu, Mana Imada, Takeshi Yanai, Tatsuo Suda, Naoyuki Takahashi, et Ryutaro Kamijo.** « Identification of a BMP-Responsive Element in Id1, the Gene for Inhibition of Myogenesis ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 7, n° 9 (septembre 2002): 949-60.
- Katagiri, Takenobu, et Tetsuro Watabe.** « Bone Morphogenetic Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8, n° 6 (1 juin 2016). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>.
- Kessler, E., K. Takahara, L. Biniaminov, M. Brusel, et D. S. Greenspan.** « Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase ». *Science (New York, N.Y.)* 271, n° 5247 (19 janvier 1996): 360-62. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.360>.
- Kim, Y. H., M.-J. Kim, S.-W. Choe, D. Sprecher, Y. J. Lee, et S. P. Oh.** « Selective Effects of Oral Antiangiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors on an Animal Model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 15, n° 6 (2017): 1095-1102. <https://doi.org/10.1111/jth.13683>.
- Kiyono, Mari, et Masabumi Shibuya.** « Bone Morphogenetic Protein 4 Mediates Apoptosis of Capillary Endothelial Cells during Rat Pupillary Membrane Regression ». *Molecular and Cellular Biology* 23, n° 13 (juillet 2003): 4627-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.13.4627-4636.2003>.
- Klepfish, A., A. Berrebi, et A. Schattner.** « Intranasal Tranexamic Acid Treatment for Severe Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Archives of Internal Medicine* 161, n° 5 (12 mars 2001): 767. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.5.767>.
- Kokabu, Shoichiro, Laura Gamer, Karen Cox, Jonathan Lowery, Kunikazu Tsuji, Regina Raz, Aris Economides, Takenobu Katagiri, et Vicki Rosen.** « BMP3 Suppresses Osteoblast Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells via Interaction with Acvr2b ». *Molecular*

*Endocrinology* (Baltimore, Md.) 26, n° 1 (janvier 2012): 87-94.  
<https://doi.org/10.1210/me.2011-1168>.

**Korchynskiy, Olexander, et Peter ten Dijke.** « Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-Specific Response Elements in the Id1 Promoter ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 7 (15 février 2002): 4883-91.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111023200>.

**Kovacs-Sipos, Evelin, David Holzmann, Thomas Scherer, et Michael B. Soyka.** « Nintedanib as a Novel Treatment Option in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *BMJ Case Reports* 2017 (26 juin 2017). <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-219393>.

**Kurstin, Ronald.** « Using Thalidomide in a Patient with Epithelioid Leiomyosarcoma and Osler-Weber-Rendu Disease ». *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 16, n° 1 (janvier 2002): 21-24.

**Lacroix, P.** « Recent Investigations on the Growth of Bone ». *Nature* 156, n° 3967 (novembre 1945): 576-576. <https://doi.org/10.1038/156576a0>.

**Lau, Edmund M. T., Eleni Giannoulidou, David S. Celermajer, et Marc Humbert.** « Epidemiology and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Nature Reviews. Cardiology* 14, n° 10 (octobre 2017): 603-14. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.84>.

**Lavoisier, Antoine-Laurent de** (1743-1794) Auteur du texte. *Traité élémentaire de chimie. Tome 1 / , présenté dans un ordre nouveau, et d'après les découvertes modernes ; avec figures : par M. Lavoisier... Seconde édition*, 1793. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k5524956g>.

**Lazaraki, Georgia, Evangelos Akriviadis, Ioannis Pilpilidis, Ioanna Parisi, Dimitrios Tzilves, et Anestis Tarpangos.** « Low Dose of Bevacizumab Is Safe and Effective in Preventing Bleeding Episodes in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The American Journal of Gastroenterology* 106, n° 12 (décembre 2011): 2204-6. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.287>.

**Léauté-Labrèze, Christine, Eric Dumas de la Roque, Thomas Hubiche, Franck Boralevi, Jean-Benoît Thambo, et Alain Taïeb.** « Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy ». *The New England Journal of Medicine* 358, n° 24 (12 juin 2008): 2649-51. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0708819>.

**Lebrin, Franck, Samly Srun, Karine Raymond, Sabrina Martin, Stieneke van den Brink, Catarina Freitas, Christiane Bréant, et al.** « Thalidomide Stimulates Vessel Maturation and Reduces Epistaxis in Individuals with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Nature Medicine* 16, n° 4 (avril 2010): 420-28. <https://doi.org/10.1038/nm.2131>.

**Lee, Nam Y., Kellye C. Kirkbride, Richard D. Sheu, et Gerard C. Blobe.** « The Transforming Growth Factor-Beta Type III Receptor Mediates Distinct Subcellular Trafficking and Downstream Signaling of Activin-like Kinase (ALK)3 and ALK6 Receptors ». *Molecular Biology of the Cell* 20, n° 20 (octobre 2009): 4362-70. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0539>.

**Lerut, Jan, Giuseppe Orlando, René Adam, Carlo Sabbà, Robert Pfitzmann, Jurgen Klempnauer, Jacques Belghiti, et al.** « Liver Transplantation for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Report of the European Liver Transplant Registry ». *Annals of Surgery* 244, n° 6 (décembre 2006): 854-862; discussion 862-864. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000247258.35406.a4>.

**Levet, Sandrine, Delphine Ciais, Galina Merdzhanova, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Fabrice P. Navarro, et al.** « Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) Controls Lymphatic



- Vessel Maturation and Valve Formation ». *Blood* 122, n° 4 (25 juillet 2013): 598-607. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-472142>.
- Li, D. Y., L. K. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness, E. C. Davis, D. G. Taylor, B. B. Boak, et D. P. Wendel.** « Defective Angiogenesis in Mice Lacking Endoglin ». *Science (New York, N.Y.)* 284, n° 5419 (28 mai 1999): 1534-37. <https://doi.org/10.1126/science.284.5419.1534>.
- Lin, Jingmei, Sanjeevkumar R. Patel, Min Wang, et Gregory R. Dressler.** « The Cysteine-Rich Domain Protein KCP Is a Suppressor of Transforming Growth Factor Beta/Activin Signaling in Renal Epithelia ». *Molecular and Cellular Biology* 26, n° 12 (juin 2006): 4577-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.02127-05>.
- Lin, Shuxian, Kathy K. H. Svoboda, Jian Q. Feng, et Xinquan Jiang.** « The Biological Function of Type I Receptors of Bone Morphogenetic Protein in Bone ». *Bone Research* 4 (5 avril 2016): 16005. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.5>.
- Liu, Dong, Jian Wang, Bernd Kinzel, Matthias Müller, Xiaohong Mao, Reginald Valdez, Yongxing Liu, et En Li.** « Dosage-Dependent Requirement of BMP Type II Receptor for Maintenance of Vascular Integrity ». *Blood* 110, n° 5 (1 septembre 2007): 1502-10. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-058594>.
- Long, Lu, Margaret R. MacLean, Trina K. Jeffery, Ian Morecroft, Xudong Yang, Nung Rudarakanchana, Mark Southwood, Victoria James, Richard C. Trembath, et Nicholas W. Morrell.** « Serotonin Increases Susceptibility to Pulmonary Hypertension in BMP2-Deficient Mice ». *Circulation Research* 98, n° 6 (31 mars 2006): 818-27. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000215809.47923.fd>.
- López-Rovira, Teresa, Elisabet Chaux, Joan Massagué, Jose Luis Rosa, et Francesc Ventura.** « Direct Binding of Smad1 and Smad4 to Two Distinct Motifs Mediates Bone Morphogenetic Protein-Specific Transcriptional Activation of Id1 Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 277, n° 5 (1 février 2002): 3176-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106826200>.
- Lowery, Jonathan W., et Mark P. de Caestecker.** « BMP Signaling in Vascular Development and Disease ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21, n° 4 (août 2010): 287-98. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.06.001>.
- Lozano, Miguel.** « Tranexamic Acid in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The New England Journal of Medicine* 346, n° 6 (7 février 2002): 457. <https://doi.org/10.1056/NEJM200202073460620>.
- Lupu, Alexandru, Carmen Stefanescu, Xavier Treton, Alain Attar, Olivier Corcos, et Yoram Bouhnik.** « Bevacizumab as Rescue Treatment for Severe Recurrent Gastrointestinal Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Clinical Gastroenterology* 47, n° 3 (mars 2013): 256-57. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182688d49>.
- Luyten, F. P., N. S. Cunningham, S. Vukicevic, V. Paralkar, U. Ripamonti, et A. H. Reddi.** « Advances in Osteogenin and Related Bone Morphogenetic Proteins in Bone Induction and Repair ». *Acta Orthopaedica Belgica* 58 Suppl 1 (1992): 263-67.
- Lyons, G. D., R. E. Owens, et D. F. Mouney.** « Argon Laser Destruction of Cutaneous Telangiectatic Lesions ». *The Laryngoscope* 91, n° 8 (août 1981): 1322-25. <https://doi.org/10.1288/00005537-198108000-00014>.

- Lyons, K. M., R. W. Pelton, et B. L. Hogan.** « Patterns of Expression of Murine Vgr-1 and BMP-2a RNA Suggest That Transforming Growth Factor-Beta-like Genes Coordinately Regulate Aspects of Embryonic Development ». *Genes & Development* 3, n° 11 (novembre 1989): 1657-68. <https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1657>.
- Macarron, Ricardo, Martyn N. Banks, Dejan Bojanic, David J. Burns, Dragan A. Cirovic, Tina Garyantes, Darren V. S. Green, et al.** « Impact of high-throughput screening in biomedical research ». *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (1 mars 2011): 188.
- Machado, R. D., M. W. Pauciulo, J. R. Thomson, K. B. Lane, N. V. Morgan, L. Wheeler, J. A. Phillips, et al.** « BMPR2 Haploinsufficiency as the Inherited Molecular Mechanism for Primary Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Human Genetics* 68, n° 1 (janvier 2001): 92-102. <https://doi.org/10.1086/316947>.
- Mager, Johannes J., Timotheus T. C. Overtoom, Hylke Blauw, Jan W. J. Lammers, et Cornelius J. J. Westermann.** « Embolotherapy of Pulmonary Arteriovenous Malformations: Long-Term Results in 112 Patients ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR* 15, n° 5 (mai 2004): 451-56.
- Marqués, G., M. Musacchio, M. J. Shimell, K. Wünnenberg-Stapleton, K. W. Cho, et M. B. O'Connor.** « Production of a DPP Activity Gradient in the Early Drosophila Embryo through the Opposing Actions of the SOG and TLD Proteins ». *Cell* 91, n° 3 (31 octobre 1997): 417-26. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80425-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80425-0).
- Mazerbourg, Sabine, Cynthia Klein, Jaesook Roh, Noora Kaivo-Oja, David G. Mottershead, Olexander Korchynskyi, Olli Ritvos, et Aaron J. W. Hsueh.** « Growth Differentiation Factor-9 Signaling Is Mediated by the Type I Receptor, Activin Receptor-like Kinase 5 ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, n° 3 (mars 2004): 653-65. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0393>.
- McAllister, K. A., K. M. Grogg, D. W. Johnson, C. J. Gallione, M. A. Baldwin, C. E. Jackson, E. A. Helmbold, D. S. Markel, W. C. McKinnon, et J. Murrell.** « Endoglin, a TGF-Beta Binding Protein of Endothelial Cells, Is the Gene for Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia Type 1 ». *Nature Genetics* 8, n° 4 (décembre 1994): 345-51. <https://doi.org/10.1038/ng1294-345>.
- McLaughlin, Vallerie V., Raymond L. Benza, Lewis J. Rubin, Richard N. Channick, Robert Voswinckel, Victor F. Tapson, Ivan M. Robbins, Horst Olschewski, Melvyn Rubenfire, et Werner Seeger.** « Addition of Inhaled Treprostinil to Oral Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: A Randomized Controlled Clinical Trial ». *Journal of the American College of Cardiology* 55, n° 18 (4 mai 2010): 1915-22. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.01.027>.
- McMurtry, M. Sean, Sebastien Bonnet, Xichen Wu, Jason R. B. Dyck, Alois Haromy, Kyoko Hashimoto, et Evangelos D. Michelakis.** « Dichloroacetate Prevents and Reverses Pulmonary Hypertension by Inducing Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Apoptosis ». *Circulation Research* 95, n° 8 (15 octobre 2004): 830-40. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000145360.16770.9f>.
- Mitchell, Andrew, Leon A. Adams, Gerry MacQuillan, Jon Tibballs, Rohan vanden Driesen, et Luc Delriviere.** « Bevacizumab Reverses Need for Liver Transplantation in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the*

*Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 14, n° 2 (février 2008): 210-13. <https://doi.org/10.1002/lt.21417>.

**Miyazawa, Keiji, et Kohei Miyazono.** « Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9, n° 3 (mars 2017). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022095>.

**Miyazono, Kohei, Yuto Kamiya, et Masato Morikawa.** « Bone Morphogenetic Protein Receptors and Signal Transduction ». *Journal of Biochemistry* 147, n° 1 (janvier 2010): 35-51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>.

**Morikawa, M., D. Koinuma, K. Miyazono, et C.-H. Heldin.** « Genome-Wide Mechanisms of Smad Binding ». *Oncogene* 32, n° 13 (28 mars 2013): 1609-15. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.191>.

**Morrell, N. W., X. Yang, P. D. Upton, K. B. Jourdan, N. Morgan, K. K. Sheares, et R. C. Trembath.** « 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, n° 7 (14 août 2001): 790-95. <https://doi.org/10.1161/hc3201.094152>.

**Moser, Martin, Olav Binder, Yaxu Wu, Julius Aitsebaomo, Rongqin Ren, Christoph Bode, Victoria L. Bautch, Frank L. Conlon, et Cam Patterson.** « BMPER, a Novel Endothelial Cell Precursor-Derived Protein, Antagonizes Bone Morphogenetic Protein Signaling and Endothelial Cell Differentiation ». *Molecular and Cellular Biology* 23, n° 16 (août 2003): 5664-79. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.16.5664-5679.2003>.

**Naeije, Robert, et Alessandra Manes.** « The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 23, n° 134 (décembre 2014): 476-87. <https://doi.org/10.1183/09059180.00007414>.

**Nakase, T., S. Nomura, H. Yoshikawa, J. Hashimoto, S. Hirota, Y. Kitamura, S. Oikawa, K. Ono, et K. Takaoka.** « Transient and Localized Expression of Bone Morphogenetic Protein 4 Messenger RNA during Fracture Healing ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9, n° 5 (mai 1994): 651-59. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090510>.

**Nasim, Md Talat, Takeshi Ogo, Mohammad Ahmed, Rebecca Randall, Hasnin M. Chowdhury, Katie M. Snape, Teisha Y. Bradshaw, et al.** « Molecular Genetic Characterization of SMAD Signaling Molecules in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Human Mutation* 32, n° 12 (décembre 2011): 1385-89. <https://doi.org/10.1002/humu.21605>.

**Nelsen, Sylvia M., et Jan L. Christian.** « Site-Specific Cleavage of BMP4 by Furin, PC6, and PC7 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284, n° 40 (2 octobre 2009): 27157-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.028506>.

**Niessen, Kyle, Gu Zhang, John Brady Ridgway, Hao Chen, et Minhong Yan.** « ALK1 Signaling Regulates Early Postnatal Lymphatic Vessel Development ». *Blood* 115, n° 8 (25 février 2010): 1654-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235655>.

**Nili, Mahta, Ujwal Shinde, et Peter Rotwein.** « Soluble Repulsive Guidance Molecule c/Hemojuvelin Is a Broad Spectrum Bone Morphogenetic Protein (BMP) Antagonist and

Inhibits Both BMP2- and BMP6-Mediated Signaling and Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 285, n° 32 (6 août 2010): 24783-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130286>.

**Nishitoh, H., H. Ichijo, M. Kimura, T. Matsumoto, F. Makishima, A. Yamaguchi, H. Yamashita, S. Enomoto, et K. Miyazono.** « Identification of Type I and Type II Serine/Threonine Kinase Receptors for Growth/Differentiation Factor-5 ». *The Journal of Biological Chemistry* 271, n° 35 (30 août 1996): 21345-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21345>.

**Nolan-Stevaux, Olivier, Wendy Zhong, Stacey Culp, Kathy Shaffer, Joseph Hoover, Dineli Wickramasinghe, et Astrid Ruefli-Brasse.** « Endoglin Requirement for BMP9 Signaling in Endothelial Cells Reveals New Mechanism of Action for Selective Anti-Endoglin Antibodies ». *PLoS One* 7, n° 12 (2012): e50920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050920>.

**Oh, S. Paul, Tsugio Seki, Kendrick A. Goss, Takeshi Imamura, Youngsuk Yi, Patricia K. Donahoe, Li Li, et al.** « Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, n° 6 (14 mars 2000): 2626-31.

**Olschewski, H., F. Rose, E. Grünig, H. A. Ghofrani, D. Walrath, R. Schulz, R. Schermuly, F. Grimminger, et W. Seeger.** « Cellular Pathophysiology and Therapy of Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 138, n° 6 (décembre 2001): 367-77. <https://doi.org/10.1067/mlc.2001.119285>.

**Ondra, S. L., H. Troupp, E. D. George, et K. Schwab.** « The Natural History of Symptomatic Arteriovenous Malformations of the Brain: A 24-Year Follow-up Assessment ». *Journal of Neurosurgery* 73, n° 3 (septembre 1990): 387-91. <https://doi.org/10.3171/jns.1990.73.3.0387>.

**Onichtchouk, D., Y. G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massagué, et C. Niehrs.** « Silencing of TGF- $\beta$  Signaling by the Pseudoreceptor BAMBI ». *Nature* 401, n° 6752 (30 septembre 1999): 480-85. <https://doi.org/10.1038/46794>.

**Oosting, Sjoukje, Wouter Nagengast, et Elisabeth de Vries.** « More on Bevacizumab in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The New England Journal of Medicine* 361, n° 9 (27 août 2009): 931; author reply 931-932. <https://doi.org/10.1056/NEJMc091271>.

**Otten, Cécile, Jessica Knox, Gwénola Boulday, Mathias Eymery, Marta Haniszewski, Martin Neuenschwander, Silke Radetzki, et al.** « Systematic Pharmacological Screens Uncover Novel Pathways Involved in Cerebral Cavernous Malformations ». *EMBO Molecular Medicine* 10, n° 10 (2018). <https://doi.org/10.15252/emmm.201809155>.

**Ouarné, Marie, Claire Bouvard, Gabriela Boneva, Christine Mallet, Johnny Ribeiro, Agnès Desroches-Castan, Emmanuelle Soleilhac, Emmanuelle Tillet, Olivier Peyruchaud, et Sabine Bailly.** « BMP9, but Not BMP10, Acts as a Quiescence Factor on Tumor Growth, Vessel Normalization and Metastasis in a Mouse Model of Breast Cancer ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 37, n° 1 (30 août 2018): 209. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0885-1>.

- Ozkaynak, E., D. C. Rueger, E. A. Drier, C. Corbett, R. J. Ridge, T. K. Sampath, et H. Oppermann.** « OP-1 CDNA Encodes an Osteogenic Protein in the TGF-Beta Family ». *The EMBO Journal* 9, n° 7 (juillet 1990): 2085-93.
- Ozkaynak, E., P. N. Schnegelsberg, D. F. Jin, G. M. Clifford, F. D. Warren, E. A. Drier, et H. Oppermann.** « Osteogenic Protein-2. A New Member of the Transforming Growth Factor-Beta Superfamily Expressed Early in Embryogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 267, n° 35 (15 décembre 1992): 25220-27.
- Parmacek, Michael S., et Jonathan A. Epstein.** « Cardiomyocyte Renewal ». *The New England Journal of Medicine* 361, n° 1 (2 juillet 2009): 86-88. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0903347>.
- Pereira, D A, et J A Williams.** « Origin and evolution of high throughput screening ». *British journal of pharmacology* 152, n° 1 (septembre 2007): 53-61. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707373>.
- Pereira, R. C., A. N. Economides, et E. Canalis.** « Bone Morphogenetic Proteins Induce Gremlin, a Protein That Limits Their Activity in Osteoblasts ». *Endocrinology* 141, n° 12 (décembre 2000): 4558-63. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7851>.
- Pérez-Encinas, Manuel, Maria José Rabuñal Martínez, et José Luis Bello López.** « Is Thalidomide Effective for the Treatment of Gastrointestinal Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia? » *Haematologica* 87, n° 8 (août 2002): ELT34.
- Perros, Frédéric, Sylvia Cohen-Kaminsky, Natalia Gambaryan, Barbara Girerd, Nicolas Raymond, Isabelle Klingelschmitt, Alice Huertas, et al.** « Cytotoxic Cells and Granulysin in Pulmonary Arterial Hypertension and Pulmonary Veno-Occlusive Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187, n° 2 (15 janvier 2013): 189-96. <https://doi.org/10.1164/rccm.201208-1364OC>.
- Piccolo, S., E. Agius, B. Lu, S. Goodman, L. Dale, et E. M. De Robertis.** « Cleavage of Chordin by Xolloid Metalloprotease Suggests a Role for Proteolytic Processing in the Regulation of Spemann Organizer Activity ». *Cell* 91, n° 3 (31 octobre 1997): 407-16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80424-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80424-9).
- Pollak, Jeffrey S., Sanjay Saluja, Ashraf Thabet, Katharine J. Henderson, Neil Denbow, et Robert I. White.** « Clinical and Anatomic Outcomes after Embolotherapy of Pulmonary Arteriovenous Malformations ». *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR* 17, n° 1 (janvier 2006): 35-44; quiz 45. <https://doi.org/10.1097/01.RVI.0000191410.13974.B6>.
- Price, Laura C., S. John Wort, Frédéric Perros, Peter Dorfmueller, Alice Huertas, David Montani, Sylvia Cohen-Kaminsky, et Marc Humbert.** « Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Chest* 141, n° 1 (janvier 2012): 210-21. <https://doi.org/10.1378/chest.11-0793>.
- Pulido, Tomás, Igor Adzerikho, Richard N. Channick, Marion Delcroix, Nazzareno Galiè, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Pavel Jansa, et al.** « Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 369, n° 9 (29 août 2013): 809-18. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213917>.
- Pushpakom, Sudeep, Francesco Iorio, Patrick A. Eyers, K. Jane Escott, Shirley Hopper, Andrew Wells, Andrew Doig, et al.** « Drug Repurposing: Progress, Challenges and

- Recommendations ». *Nature Reviews Drug Discovery* 18, n° 1 (janvier 2019): 41-58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- Rabinovitch, Marlene.** « Molecular Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 118, n° 7 (juillet 2008): 2372-79. <https://doi.org/10.1172/JCI33452>.
- Renaud, Ronald C., et Hayley Xuereb.** « Erectile-Dysfunction Therapies ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 1, n° 9 (septembre 2002): 663-64. <https://doi.org/10.1038/nrd898>.
- Revenu, Nicole, Laurence M. Boon, John B. Mulliken, Odile Enjolras, Maria Rosa Cordisco, Patricia E. Burrows, Philippe Clapuyt, et al.** « Parkes Weber Syndrome, Vein of Galen Aneurysmal Malformation, and Other Fast-Flow Vascular Anomalies Are Caused by RASA1 Mutations ». *Human Mutation* 29, n° 7 (juillet 2008): 959-65. <https://doi.org/10.1002/humu.20746>.
- Revenu, N., et M. Vikkula.** « Cerebral Cavernous Malformation: New Molecular and Clinical Insights ». *Journal of Medical Genetics* 43, n° 9 (septembre 2006): 716-21. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041079>.
- Ricard, Nicolas, Delphine Ciais, Sandrine Levet, Mariela Subileau, Christine Mallet, Teresa A. Zimmers, Se-Jin Lee, Marie Bidart, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « BMP9 and BMP10 Are Critical for Postnatal Retinal Vascular Remodeling ». *Blood* 119, n° 25 (21 juin 2012): 6162-71. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-407593>.
- Rosen, V., J. M. Wozney, E. A. Wang, P. Cordes, A. Celeste, D. McQuaid, et L. Kurtzberg.** « Purification and Molecular Cloning of a Novel Group of BMPs and Localization of BMP mRNA in Developing Bone ». *Connective Tissue Research* 20, n° 1-4 (1989): 313-19.
- Rosenzweig, B. L., T. Imamura, T. Okadome, G. N. Cox, H. Yamashita, P. ten Dijke, C. H. Heldin, et K. Miyazono.** « Cloning and Characterization of a Human Type II Receptor for Bone Morphogenetic Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, n° 17 (15 août 1995): 7632-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7632>.
- Rubin, Lewis J., David B. Badesch, Robyn J. Barst, Nazzareno Galie, Carol M. Black, Anne Keogh, Tomas Pulido, et al.** « Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 346, n° 12 (21 mars 2002): 896-903. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012212>.
- Rubin, Lewis J., David B. Badesch, Thomas R. Fleming, Nazzareno Galiè, Gerald Simonneau, Hossein A. Ghofrani, Michael Oakes, et al.** « Long-Term Treatment with Sildenafil Citrate in Pulmonary Arterial Hypertension: The SUPER-2 Study ». *Chest* 140, n° 5 (novembre 2011): 1274-83. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0969>.
- Ruiz, Santiago, Pallavi Chandakkar, Haitian Zhao, Julien Papoin, Prodyot K Chatterjee, Erica Christen, Christine N Metz, Lionel Blanc, Fabien Campagne, et Philippe Marambaud.** « Tacrolimus rescues the signaling and gene expression signature of endothelial ALK1 loss-of-function and improves HHT vascular pathology ». *Human Molecular Genetics* 26, n° 24 (15 décembre 2017): 4786-98. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx358>.

- Ruiz, Santiago, Haitian Zhao, Pallavi Chandakkar, Prodyot K. Chatterjee, Julien Papoin, Lionel Blanc, Christine N. Metz, Fabien Campagne, et Philippe Marambaud.** « A Mouse Model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Generated by Transmammary-Delivered Immunoblocking of BMP9 and BMP10 ». *Scientific Reports* 5 (22 2016): 37366. <https://doi.org/10.1038/srep37366>.
- Rybalkin, Sergei D., Chen Yan, Karin E. Bornfeldt, et Joseph A. Beavo.** « Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function ». *Circulation Research* 93, n° 4 (22 août 2003): 280-91. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000087541.15600.2B>.
- Sabbà, C., M. Gallitelli, et G. Palasciano.** « Efficacy of Unusually High Doses of Tranexamic Acid for the Treatment of Epistaxis in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The New England Journal of Medicine* 345, n° 12 (20 septembre 2001): 926. <https://doi.org/10.1056/NEJM200109203451216>.
- Samad, Tarek A., Anuradha Rebbapragada, Esther Bell, Ying Zhang, Yisrael Sidis, Sung-Jin Jeong, Jason A. Campagna, et al.** « DRAGON, a Bone Morphogenetic Protein Co-Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 14 (8 avril 2005): 14122-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410034200>.
- Sampath, T. K., J. E. Coughlin, R. M. Whetstone, D. Banach, C. Corbett, R. J. Ridge, E. Ozkaynak, H. Oppermann, et D. C. Rueger.** « Bovine Osteogenic Protein Is Composed of Dimers of OP-1 and BMP-2A, Two Members of the Transforming Growth Factor-Beta Superfamily ». *The Journal of Biological Chemistry* 265, n° 22 (5 août 1990): 13198-205.
- Satoh, Kimio, Nobuhiro Kikuchi, Taijyu Satoh, Ryo Kurosawa, Shinichiro Sunamura, . Mohammad Siddique, Junichi Omura, Nobuhiro Yaoita, et Hiroaki Shimokawa.** « Identification of Novel Therapeutic Targets for Pulmonary Arterial Hypertension ». *International Journal of Molecular Sciences* 19, n° 12 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19124081>.
- Satoh Kimio, Matoba Tetsuya, Suzuki Jun, O'Dell Michael R., Nigro Patrizia, Cui Zhaoqiang, Mohan Amy, et al.** « Cyclophilin A Mediates Vascular Remodeling by Promoting Inflammation and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation ». *Circulation* 117, n° 24 (17 juin 2008): 3088-98. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.756106>.
- Scharpfenecker, Marion, Maarten van Dinther, Zhen Liu, Rutger L. van Bezooijen, Qinghai Zhao, Laurie Pukac, Clemens W. G. M. Löwik, et P. ten Dijke.** « BMP-9 Signals via ALK1 and Inhibits BFGF-Induced Endothelial Cell Proliferation and VEGF-Stimulated Angiogenesis ». *Journal of Cell Science* 120, n° Pt 6 (15 mars 2007): 964-72. <https://doi.org/10.1242/jcs.002949>.
- Seki Tsugio, Yun Jihye, et Oh S. Paul.** « Arterial Endothelium-Specific Activin Receptor-Like Kinase 1 Expression Suggests Its Role in Arterialization and Vascular Remodeling ». *Circulation Research* 93, n° 7 (3 octobre 2003): 682-89. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000095246.40391.3B>.
- Seront, Emmanuel, An Van Damme, Laurence M. Boon, et Miikka Vikkula.** « Rapamycin and Treatment of Venous Malformations ». *Current Opinion in Hematology* 26, n° 3 (mai 2019): 185. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000498>.
- Shafritz, A. B., E. M. Shore, F. H. Gannon, M. A. Zasloff, R. Taub, M. Muenke, et F. S. Kaplan.** « Overexpression of an Osteogenic Morphogen in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva ». *The*

*New England Journal of Medicine* 335, n° 8 (22 août 1996): 555-61.  
<https://doi.org/10.1056/NEJM199608223350804>.

**Sharma, Abhishek, Chukwudi Obiagwu, Kenechukwu Mezue, Aakash Garg, Debabrata Mukherjee, Jennifer Haythe, Vijay Shetty, et Andrew J. Einstein.** « Role of Vasodilator Testing in Pulmonary Hypertension ». *Emerging Trends and Current Controversies in Heart Failure* 58, n° 4 (1 janvier 2016): 425-33. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2015.09.006>.

**Shintani, M., H. Yagi, T. Nakayama, T. Saji, et R. Matsuoka.** « A New Nonsense Mutation of SMAD8 Associated with Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of Medical Genetics* 46, n° 5 (mai 2009): 331-37. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.062703>.

**Shovlin, C. L., A. E. Guttmacher, E. Buscarini, M. E. Faughnan, R. H. Hyland, C. J. Westermann, A. D. Kjeldsen, et H. Plauchu.** « Diagnostic Criteria for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Syndrome) ». *American Journal of Medical Genetics* 91, n° 1 (6 mars 2000): 66-67.

**Shovlin, Claire L.** « Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment ». *Blood Reviews* 24, n° 6 (novembre 2010): 203-19. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.07.001>.

**Sieber, Christina, Jessica Kopf, Christian Hiepen, et Petra Knaus.** « Recent Advances in BMP Receptor Signaling ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 20, n° 5-6 (décembre 2009): 343-55. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.007>.

**Sitbon, Olivier, Richard Channick, Kelly M. Chin, Aline Frey, Sean Gaine, Nazzareno Galiè, Hossein-Ardeschir Ghofrani, et al.** « Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 373, n° 26 (24 décembre 2015): 2522-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503184>.

**Sitbon, Olivier, Marion Delcroix, Emmanuel Bergot, Anco B. Boonstra, John Granton, David Langleben, Pilar Escribano Subías, et al.** « EPITOME-2: An Open-Label Study Assessing the Transition to a New Formulation of Intravenous Epoprostenol in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Heart Journal* 167, n° 2 (février 2014): 210-17. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2013.08.007>.

**Skaro, Anton I., Paul J. Marotta, et Vivian C. McAlister.** « Regression of Cutaneous and Gastrointestinal Telangiectasia with Sirolimus and Aspirin in a Patient with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *Annals of Internal Medicine* 144, n° 3 (7 février 2006): 226-27. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-3-200602070-00030>.

**Sommer, N.** « Treatment with low-dose tacrolimus inhibits bleeding complications in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arterial hypertension ». *Pulmonary Circulation* 9, n° 2 (2018): 1-3. <https://doi.org/10.1177/2045894018805406>.

**Song, Yanli, John E. Jones, Hideyuki Beppu, John F. Keaney, Joseph Loscalzo, et Ying-Yi Zhang.** « Increased Susceptibility to Pulmonary Hypertension in Heterozygous BMPR2-Mutant Mice ». *Circulation* 112, n° 4 (26 juillet 2005): 553-62. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.492488>.

**Soubrier, Florent, Wendy K. Chung, Rajiv Machado, Ekkehard Grünig, Micheala Aldred, Mark Geraci, James E. Loyd, et al.** « Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension ».



*Journal of the American College of Cardiology* 62, n° 25 Suppl (24 décembre 2013): D13-21.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.10.035>.

**Spiekerkoetter, Edda, Yon K. Sung, Deepti Sudheendra, Matthew Bill, Micheala A. Aldred, Mariëlle C. van de Veerdonk, Anton Vonk Noordegraaf, et al.** « Low-Dose FK506 (Tacrolimus) in End-Stage Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192, n° 2 (15 juillet 2015): 254-57. <https://doi.org/10.1164/rccm.201411-2061LE>.

**Spiekerkoetter, Edda, Yon K. Sung, Deepti Sudheendra, Valerie Scott, Patricia Del Rosario, Matthew Bill, Francois Haddad, Janel Long-Boyle, Haley Hedlin, et Roham T. Zamanian.** « Randomised Placebo-Controlled Safety and Tolerability Trial of FK506 (Tacrolimus) for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 50, n° 3 (2017). <https://doi.org/10.1183/13993003.02449-2016>.

**Spiekerkoetter, Edda, Xuefei Tian, Jie Cai, Rachel K. Hopper, Deepti Sudheendra, Caiyun G. Li, Nesrine El-Bizri, et al.** « FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 123, n° 8 (1 août 2013): 3600-3613. <https://doi.org/10.1172/JCI65592>.

**Srinivasan, Sudha, Martha A. Hanes, Tayeashai Dickens, Mary E. M. Porteous, S. Paul Oh, Laura P. Hale, et Douglas A. Marchuk.** « A Mouse Model for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) Type 2 ». *Human Molecular Genetics* 12, n° 5 (1 mars 2003): 473-82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg050>.

**Stahl, Andreas, Kip M. Connor, Przemyslaw Sapielha, Jing Chen, Roberta J. Dennison, Nathan M. Krah, Molly R. Seaward, et al.** « The Mouse Retina as an Angiogenesis Model ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51, n° 6 (juin 2010): 2813-26. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176>.

**Stasch, J. P., E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowsky, A. Feurer, R. Gerzer, et al.** « NO-Independent Regulatory Site on Soluble Guanylate Cyclase ». *Nature* 410, n° 6825 (8 mars 2001): 212-15. <https://doi.org/10.1038/35065611>.

**Stasch, Johannes-Peter, Pál Pacher, et Oleg V. Evgenov.** « Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease ». *Circulation* 123, n° 20 (24 mai 2011): 2263-73. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.981738>.

**Suppressa, Patrizia, Suppressa Patrizia, Arcangelo Liso, Liso Arcangelo, Carlo Sabbà, et Sabbà Carlo.** « Low Dose Intravenous Bevacizumab for the Treatment of Anaemia in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *British Journal of Haematology* 152, n° 4 (février 2011): 365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08481.x>.

**Suzuki, A., E. Kaneko, N. Ueno, et A. Hemmati-Brivanlou.** « Regulation of Epidermal Induction by BMP2 and BMP7 Signaling ». *Developmental Biology* 189, n° 1 (1 septembre 1997): 112-22. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8652>.

**Dijke, P. ten, H. Yamashita, T. K. Sampath, A. H. Reddi, M. Estevez, D. L. Riddle, H. Ichijo, C. H. Heldin, et K. Miyazono.** « Identification of Type I Receptors for Osteogenic Protein-1 and Bone Morphogenetic Protein-4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 269, n° 25 (24 juin 1994): 16985-88.

- Suzuki, Yuka, Kevin Montagne, Ayako Nishihara, Tetsuro Watabe, et Kohei Miyazono.** « BMPs Promote Proliferation and Migration of Endothelial Cells via Stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and Angiopoietin-1/Tie2 Signalling ». *Journal of Biochemistry* 143, n° 2 (février 2008): 199-206. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm215>.
- Suzuki, Yuka, Noritaka Ohga, Yasuyuki Morishita, Kyoko Hida, Kohei Miyazono, et Tetsuro Watabe.** « BMP-9 Induces Proliferation of Multiple Types of Endothelial Cells in Vitro and in Vivo ». *Journal of Cell Science* 123, n° Pt 10 (15 mai 2010): 1684-92. <https://doi.org/10.1242/jcs.061556>.
- Takase, M., T. Imamura, T. K. Sampath, K. Takeda, H. Ichijo, K. Miyazono, et M. Kawabata.** « Induction of Smad6 mRNA by Bone Morphogenetic Proteins ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244, n° 1 (6 mars 1998): 26-29. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8200>.
- Tamby, M. C., Y. Chauseaud, M. Humbert, J. Fermanian, P. Guilpain, P. Garcia-de-la-Peña-Lefebvre, S. Brunet, et al.** « Anti-Endothelial Cell Antibodies in Idiopathic and Systemic Sclerosis Associated Pulmonary Arterial Hypertension ». *Thorax* 60, n° 9 (septembre 2005): 765-72. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.029082>.
- Teo, Steven K.** « Properties of Thalidomide and Its Analogues: Implications for Anticancer Therapy ». *The AAPS Journal* 7, n° 1 (22 mars 2005): E14-19. <https://doi.org/10.1208/aapsj070103>.
- Tillet, Emmanuelle, Marie Ouarné, Agnès Desroches-Castan, Christine Mallet, Mariela Subileau, Robin Didier, Anna Lioutsko, Guillaume Belthier, Jean-Jacques Feige, et Sabine Bailly.** « A Heterodimer Formed by Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9) and BMP10 Provides Most BMP Biological Activity in Plasma ». *The Journal of Biological Chemistry* 293, n° 28 (13 2018): 10963-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002968>.
- Topper, James N., Maria R. DiChiara, Jonathan D. Brown, Amy J. Williams, Dean Falb, Tucker Collins, et Michael A. Gimbrone.** « CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor  $\beta$  transcriptional responses in endothelial cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, n° 16 (4 août 1998): 9506-11.
- Trembath, R. C., J. R. Thomson, R. D. Machado, N. V. Morgan, C. Atkinson, I. Winship, G. Simonneau, et al.** « Clinical and Molecular Genetic Features of Pulmonary Hypertension in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *The New England Journal of Medicine* 345, n° 5 (2 août 2001): 325-34. <https://doi.org/10.1056/NEJM200108023450503>.
- Tsukamoto, S., T. Mizuta, M. Fujimoto, S. Ohte, K. Osawa, A. Miyamoto, K. Yoneyama, et al.** « Smad9 Is a New Type of Transcriptional Regulator in Bone Morphogenetic Protein Signaling ». *Scientific Reports* 4 (23 décembre 2014): 7596. <https://doi.org/10.1038/srep07596>.
- Tual-Chalot, Simon, S. Paul Oh, et Helen M. Arthur.** « Mouse Models of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: Recent Advances and Future Challenges ». *Frontiers in Genetics* 6 (2015): 25. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00025>.

- Uebelhoer, Melanie, Laurence M. Boon, et Miikka Vikkula.** « Vascular Anomalies: From Genetics toward Models for Therapeutic Trials ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, n° 8 (août 2012). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009688>.
- Upton, Paul D., Rachel J. Davies, Richard C. Trembath, et Nicholas W. Morrell.** « Bone Morphogenetic Protein (BMP) and Activin Type II Receptors Balance BMP9 Signals Mediated by Activin Receptor-like Kinase-1 in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 284, n° 23 (5 juin 2009): 15794-804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002881>.
- Urist, M. R.** « Bone: Formation by Autoinduction ». *Science (New York, N.Y.)* 150, n° 3698 (12 novembre 1965): 893-99. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.893>.
- Urist, M. R., S. Kovacs, et K. A. Yates.** « Regeneration of an Enchondroma Defect under the Influence of an Implant of Human Bone Morphogenetic Protein ». *The Journal of Hand Surgery* 11, n° 3 (mai 1986): 417-19. [https://doi.org/10.1016/s0363-5023\(86\)80153-8](https://doi.org/10.1016/s0363-5023(86)80153-8).
- Valdimarsdottir, Gudrun, Marie-José Goumans, Alexander Rosendahl, Martijn Brugman, Susumu Itoh, Franck Lebrin, Paschalis Sideras, et Peter ten Dijke.** « Stimulation of Id1 Expression by Bone Morphogenetic Protein Is Sufficient and Necessary for Bone Morphogenetic Protein-Induced Activation of Endothelial Cells ». *Circulation* 106, n° 17 (22 octobre 2002): 2263-70. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000033830.36431.46>.
- Vikkula, M., L. M. Boon, K. L. Carraway, J. T. Calvert, A. J. Diamonti, B. Goumnerov, K. A. Pasyk, et al.** « Vascular Dysmorphogenesis Caused by an Activating Mutation in the Receptor Tyrosine Kinase TIE2 ». *Cell* 87, n° 7 (27 décembre 1996): 1181-90. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81814-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81814-0).
- Vitali, Sally H., Georg Hansmann, Chase Rose, Angeles Fernandez-Gonzalez, Annette Scheid, S. Alex Mitsialis, et Stella Kourembanas.** « The Sugen 5416/Hypoxia Mouse Model of Pulmonary Hypertension Revisited: Long-Term Follow-Up ». *Pulmonary Circulation* 4, n° 4 (décembre 2014): 619-29. <https://doi.org/10.1086/678508>.
- Wang, E. A., V. Rosen, P. Cordes, R. M. Hewick, M. J. Kriz, D. P. Luxenberg, B. S. Sibley, et J. M. Wozney.** « Purification and Characterization of Other Distinct Bone-Inducing Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, n° 24 (1 décembre 1988): 9484-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9484>.
- Wang, Guoliang, Rui Fan, Ruirui Ji, Wenxin Zou, Daniel J. Penny, Nidhy P. Varghese, et Yuxin Fan.** « Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report ». *BMC Pulmonary Medicine* 16 (22 janvier 2016). <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0183-7>.
- Wang, Xiao-Jian, Tian-Yu Lian, Xin Jiang, Shao-Fei Liu, Su-Qi Li, Rong Jiang, Wen-Hui Wu, et al.** « Germline BMP9 Mutation Causes Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 53, n° 3 (mars 2019). <https://doi.org/10.1183/13993003.01609-2018>.
- White, R. I., A. Lynch-Nyhan, P. Terry, P. C. Buescher, E. J. Farmllett, L. Charnas, K. Shuman, W. Kim, M. Kinnison, et S. E. Mitchell.** « Pulmonary Arteriovenous Malformations: Techniques

and Long-Term Outcome of Embolotherapy ». *Radiology* 169, n° 3 (décembre 1988): 663-69. <https://doi.org/10.1148/radiology.169.3.3186989>.

**Wooderchak-Donahue, Whitney L., Jamie McDonald, Brendan O'Fallon, Paul D. Upton, Wei Li, Beth L. Roman, Sarah Young, et al.** « BMP9 Mutations Cause a Vascular-Anomaly Syndrome with Phenotypic Overlap with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ». *American Journal of Human Genetics* 93, n° 3 (5 septembre 2013): 530-37. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.004>.

**Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick, et E. A. Wang.** « Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activities ». *Science (New York, N.Y.)* 242, n° 4885 (16 décembre 1988): 1528-34. <https://doi.org/10.1126/science.3201241>.

**Xiao, Yong-Tao, Li-Xin Xiang, et Jian-Zhong Shao.** « Bone Morphogenetic Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, n° 3 (26 octobre 2007): 550-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.045>.

**Xing, Yanjiang, Shuang Zhao, Qingxia Wei, Shiqiang Gong, Xin Zhao, Fang Zhou, Rafia Al-Lamki, et al.** « A novel piperidine identified by stem cell-based screening attenuates pulmonary arterial hypertension by regulating BMP2 and PTGS2 levels ». *European Respiratory Journal* 51, n° 4 (1 avril 2018): 1702229. <https://doi.org/10.1183/13993003.02229-2017>.

**Xue, Hanqing, Jie Li, Haozhe Xie, et Yadong Wang.** « Review of Drug Repositioning Approaches and Resources ». *International Journal of Biological Sciences* 14, n° 10 (13 juillet 2018): 1232-44. <https://doi.org/10.7150/ijbs.24612>.

**Yamamoto, N., S. Akiyama, T. Katagiri, M. Namiki, T. Kurokawa, et T. Suda.** « Smad1 and Smad5 Act Downstream of Intracellular Signalings of BMP-2 That Inhibits Myogenic Differentiation and Induces Osteoblast Differentiation in C2C12 Myoblasts ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238, n° 2 (18 septembre 1997): 574-80. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7325>.

**Yoshimatsu, Yasuhiro, Yulia G. Lee, Yuichi Akatsu, Luna Taguchi, Hiroshi I. Suzuki, Sara I. Cunha, Kazuichi Maruyama, et al.** « Bone Morphogenetic Protein-9 Inhibits Lymphatic Vessel Formation via Activin Receptor-like Kinase 1 during Development and Cancer Progression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, n° 47 (19 novembre 2013): 18940-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310479110>.

**Yu, Paul B., Hideyuki Beppu, Noriko Kawai, En Li, et Kenneth D. Bloch.** « Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor Deletion Reveals BMP Ligand-Specific Gain of Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 280, n° 26 (1 juillet 2005): 24443-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502825200>.

**Yuan, J. X., A. M. Aldinger, M. Juhaszova, J. Wang, J. V. Conte, S. P. Gaine, J. B. Orens, et L. J. Rubin.** « Dysfunctional Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients with Primary Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 98, n° 14 (6 octobre 1998): 1400-1406. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.14.1400>.

- Yuan, Shaohui, Qi Pan, Wei Liu, Binqi Wu, Xiguang Han, et Zhenggang Bi.** « Recombinant BMP 4/7 Fusion Protein Induces Differentiation of Bone Marrow Stem Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 112, n° 10 (octobre 2011): 3054-60. <https://doi.org/10.1002/jcb.23230>.
- Yurchenko, Vyacheslav, Gabriele Zybarth, Matthew O'Connor, Wei Wei Dai, Giovanni Franchin, Tang Hao, Huiming Guo, et al.** « Active Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Signaling Activity via CD147 ». *Journal of Biological Chemistry* 277, n° 25 (21 juin 2002): 22959-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201593200>.
- Zheng, Wei, Natasha Thorne, et John C McKew.** « Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery ». *Drug discovery today* 18, n° 21-22 (novembre 2013): 1067-73. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.001>.
- Zilberberg, Lior, Peter ten Dijke, Lynn Y. Sakai, et Daniel B. Rifkin.** « A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity ». *BMC Cell Biology* 8, n° 1 (19 septembre 2007): 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-41>.
- « Senn on the Healing of Aseptic Bone Cavities by Implantation of Antiseptic Decalcified Bone ».** *Annals of Surgery* 10, n° 5 (novembre 1889): 352-68. <https://doi.org/10.1097/00000658-188907000-00043>.
- « -384\_-322,\_Aristoteles,\_La\_vie\_et\_les\_parties\_des\_animaux,\_FR.pdf ».**2019.  
[http://www.documentacatholicaomnia.eu/03d/-384\\_-322,\\_Aristoteles,\\_La\\_vie\\_et\\_les\\_parties\\_des\\_animaux,\\_FR.pdf](http://www.documentacatholicaomnia.eu/03d/-384_-322,_Aristoteles,_La_vie_et_les_parties_des_animaux,_FR.pdf).
- « Origine et évolution de l'appareil respiratoire aérien des Vertébrés - EM|consulte ».** 2019.  
<https://www.em-consulte.com/rmr/article/151436>.

## Liste des Abréviations (dans l'ordre d'apparition)

O<sub>2</sub> : dioxygène

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

Na<sup>+</sup> : sodium

Ca<sup>2+</sup> : calcium

K<sup>+</sup> : potassium

ATP : Adénosine triphosphate

ECG : électrocardiogramme

mV : millivolts

mmHG : millimètre de mercure

NO : oxyde nitrique

AVC : accidents vasculaires cérébraux

LDL : Low Density Lipid - lipide à faible densité

MAV : malformations artério-veineuses

HI : hémangiomes infantiles

CE : cellules endothéliales

VEGF : : facteur de croissance endothélial vasculaire

VEGFR : récepteur au VEGF

bFGF : facteur de croissance de fibroblaste basique

TIE2 : Récepteur aux angiopoïétines

ANGPT : angiopoïétine

MV : malformations veineuses

VMCM : malformations veineuses muco-cutanées

GVM : malformations glomuveneuses

BRBN : Blue Rubber Bleb Nevus

KT : syndrome Klippel – Trénaunay

MS : syndrome Maffucci

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

Akt : protéine kinase B

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MC : malformations capillaires

CM-AVM : malformations capillaires associées à une malformation artério-veineuse

FAV : fistule artérioveineuse

PKWS : syndrome de Parkes Weber

Ras : protéine Ras

GTP : Guanosine triphosphate

GDP : Guanosine diphosphate

CCM : malformations cérébrales cavernueuses

KRIT1 : KRIT1 Ankyrin Repeat Containing

PDCD10 : Programmed cell death protein 10

p38 : p38 mitogen-activated protein kinases

HMVECd : cellules endothéliales microvasculaires primaires humaines dérivées du derme

HUVEC : cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale

pp<sub>A</sub>O<sub>2</sub> : pression partielle alvéolaire en dioxygène

ppO<sub>2</sub> : pression partielle en dioxygène

H<sup>+</sup> : hydrogène

OMS : organisation mondiale de la santé

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

BCG : vaccin contre la tuberculose

BPCO : Bronchopneumopathies chroniques obstructives

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

BMP : Bone Morphogenetic Proteins

HCl : acide chlorhydrique

TGF-β : Transforming Growth Factors-beta

GDFs : Growth Differentiation Factors

cDNA : ADN complémentaires

ADN : acide désoxyribonucléique

CDMPs : protéines morphogénétiques dérivées de cartilage

OPs : protéines ostéogéniques

Vgr : Vg-related

ActRII : récepteurs de l'activine de type II

BMPRII : récepteur des BMPs de type II

ALK : Activin receptor-like kinase

SBE : Smad Binding Element

JNK : c-Jun amino-terminal kinase

ChiP : Chromatin-Immunoprecipitation

Id1 : Inhibiteur de différenciation 1

BRE : BMP-Response Element

BAMBI : BMP and activin membrane-bound inhibitor

KCP : Kielin/Chordin like protein

BMPER : BMP Binding Endothelial Regulator

RGM : repulsive guidance molecule

CBP : CREB binding protein

FOP : fibrodysplasie ossifiante progressive

HHT : Télangiectasies Hémorragiques Héritaire

ENG : Endogline

MAVP : Malformations artérielles pulmonaires

OLT : transplantation hépatique orthotopique

PDGFR : récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes

FGFR : facteur de croissance des fibroblastes

KO : Knockout

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

PDE5 : phosphodiesterase de type 5

PASMC : cellules de muscle lisse des artères pulmonaires

sGC : guanylate cyclase soluble

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique



FDA : Food and Drug Administration  
EMA : European Medicines Agency  
shRNA : short hairpin RNA  
RNA (ARN) : acide ribonucléique  
MCT : Monocrotaline  
GPCR : G-Protein Coupled Receptors  
C2C12 : cellules myoblastiques murines  
C2C12BRA : C2C12 exprimant une luciférase en réponse à un signal BMP  
FKBP12 : FK506-binding-protein-12  
PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique  
mTOR : mechanistic target of rapamycin  
hESC : cellules souches embryonnaires humaines  
BUR1 : BMP Upregulator  
HMEC-1 : cellules endothéliales microvasculaires du derme humain immortalisées  
HTRF : Homogeneous Time Resolved Fluorescence  
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert  
RT-qPCR : Reverse transcription - réaction en chaîne par polymérase quantitative  
MCS : Site de Clonage Multiple  
MLP : promoteur minimal  
HEK293T : cellules humaines embryonnaires rénales immortalisées  
UFI : Unités Fonctionnelles Infectieuses  
HMEC Metluc : HMEC-1 exprimant une *Metridia* luciférase en réponse à BMP9  
siARN : small interfering ARN  
siSCR : small interfering scramble  
HMEC FR Luc : HMEC-1 transfectées transitoirement par des plasmides pGL3 BRE Luc exprimant une luciférase en réponse à BMP9  
DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
SVF : Sérum de veau foetal  
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
RLU : Unités Relatives de Luminescence

3T3 : Fibroblastes

CHX : Cycloheximide

DRB : 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole

EC<sub>50</sub> : Concentration efficace médiane

AMPc : Adenosine monophosphate cyclique

PKA : protéine kinase A

CRE : CREB Response Element

MCF10A : cellules épithéliales fibrokystiques humaines de glandes mammaires

## Abstracts

BMP9 is a ligand of the TGF- $\beta$  family and is considered as a vascular quiescence factor. Different actors within BMP9 signaling pathway such as receptors ALK1 and BMPR2 are found to be mutated in two rare vascular diseases, Rendu-Osler disease also called Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia and Pulmonary Arterial Hypertension, which are due to endothelial dysfunction. Current treatments aim to improve symptoms in patients, without providing a real cure. Thus, it is essential today to find new etiological treatments restoring this signaling pathway. To do this, I used high-throughput screening to reposition potential drug candidates from the Prestwick and TargetMol libraries, a total of 2133 molecules approved by FDA and EMA. These screens were realized on endothelial cells models reporting the BMP9 pathway using a BMP sensitive promoter (BRE, BMP Response Element). I developed and miniaturized a first endothelial model HMEC-1 secreting a BRE-controlled *Metridia* Luciferase, then a second one using double transfection of Firefly luciferase under BRE control and Renilla Luciferase as a transfection control. The first model revealed only false positives hits. However, the second one allowed us to identify several molecules activating the cAMP pathway but which action hasn't been confirmed at molecular levels. A last screen was performed on non-endothelial cells (Myoblasts C2C12BRA), allowing us to identify two other molecules which are currently undergoing characterisations.

## Résumé

BMP9 est un ligand de la famille TGF- $\beta$  et considéré comme un facteur de quiescence vasculaire. Différents acteurs de la voie de signalisation de BMP9 comme les récepteurs ALK1, et BMPR2 sont mutés dans deux pathologies vasculaires rares, la maladie de Rendu-Osler ou Télangiectasie Hémorragique Héritaire et l'Hypertension Artérielle Pulmonaire, qui sont liées à une dysfonction endothéliale. Les traitements actuels visent à améliorer les symptômes des patients, sans apporter de réelle guérison de la maladie. Aussi, il est primordial aujourd'hui de trouver de nouveaux traitements étiologiques rétablissant cette voie de signalisation. Pour ce faire, j'ai utilisé le criblage à haut débit afin de repositionner de potentiels candidats-médicaments venant des chimiothèques Prestwick et TargetMol, comprenant au total 2133 molécules approuvées par FDA et EMA. Ces criblages ont été effectués sur des modèles de cellules endothéliales rapportant la voie BMP9 grâce à un promoteur sensible aux BMPs (BRE, BMP Response Element). J'ai développé et minaturisé un premier modèle de cellules endothéliales HMEC-1 sécrétant une *Metridia* Luciférase sous le contrôle de BRE, puis un deuxième modèle utilisant une double transfection permettant l'expression de la Firefly Luciférase sous le contrôle de BRE et de la Renilla Luciférase comme contrôle de transfection. Le premier modèle n'a révélé que des faux positifs. Par contre, le deuxième modèle m'a permis d'identifier plusieurs molécules qui ont la particularité d'activer la voie de l'AMPc mais dont l'action n'a pas pu être confirmée au niveau moléculaire. Un dernier crible utilisant des cellules non endothéliales (myoblastes C2C12BRA) a permis d'identifier deux autres molécules qui sont en cours de caractérisation.