



HAL
open science

Etude de la physiopathologie des formes héritables d'hypertension artérielle pulmonaire

Grégoire Manaud

► **To cite this version:**

Grégoire Manaud. Etude de la physiopathologie des formes héritables d'hypertension artérielle pulmonaire. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASQ026 . tel-03259832

HAL Id: tel-03259832

<https://theses.hal.science/tel-03259832v1>

Submitted on 14 Jun 2021

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.

Etude de la physiopathologie des formes héritables d'Hypertension Artérielle Pulmonaire

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Hypertension pulmonaire :
Physiopathologie et innovation thérapeutique, 92350, Le Plessis-Robinson, France.
Réfèrent : Faculté de Pharmacie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin Bicêtre,
Le 14 Décembre 2020, par

Grégoire MANAUD

Composition du Jury

M. Marc HUMBERT Professeur, PU-PH, INSERM U999, Université Paris-Saclay	Président
M. Anh Tuan DINH-XUAN Professeur, PU-PH, Inserm U1016, Université Paris Descartes	Rapporteur
Mme. Christelle GUIBERT Chargée de recherche, INSERM U1045, Université de Bordeaux, HDR	Rapporteur
M. Serge ADNOT Professeur, PU-PH, INSERM U955, UPEC, Paris-XII	Examineur
M. Luc MOUTHON Professeur, PU-PH, INSERM U1016, Université Paris Descartes	Examineur
M. Frédéric PERROS Directeur de Recherche, INSERM U999, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements	
Liste des travaux hors thèse	
Liste des travaux.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Liste des abréviations.....	
Introduction.....	1
CHAPITRE 1 : Physiologie Pulmonaire.....	1
1- Le poumon	1
2- La circulation pulmonaire.....	2
CHAPITRE 2 : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP).....	5
1- Définition de l'HTAP	5
2- Classification de l'HTAP	5
3- Epidémiologie de l'HTAP	7
4- Diagnostic de l'HTAP	8
CHAPITRE 3 : Génétique de l'HTAP	11
1- Le gène <i>BMPR2</i>	12
1-1 Les mutations du gène <i>BMPR2</i>	12
1-2 Le récepteur <i>BMPRII</i> et ses voies de signalisation et de régulation	12
1-2-1 Voie canonique dépendante des <i>SMAD</i>	15
1-2-2 Voies non canoniques indépendantes des <i>SMAD</i>	15
1-3 Relation génotype/phénotype des patients atteints d'HTAP porteurs d'une mutation du gène <i>BMPR2</i>	16
2- Les autres gènes associés à la voie du <i>TGF-β</i>	18
2-1 Les mutations des gènes <i>AVCLR1</i> et <i>ENG</i>	18
2-2 Les mutations des gènes <i>SMAD1</i> et <i>SMAD9</i>	19
2-3 Les mutations du gène <i>CAV1</i>	19
2-4 Les mutations du gène <i>GDF2</i>	20
3- Les mutations du gène <i>TBX4</i>	20
4- Les mutations des canaux ioniques (<i>KCNK3</i> , <i>ABCC8</i> et <i>KCNA5</i>)	21
5- Autres gènes impliqués dans l'homéostasie vasculaire (<i>NOTCH3</i> , <i>KDR</i>).....	22
CHAPITRE 4 : Physiopathologie de l'HTAP	23

1- Histologie de l'HTAP	26
1-1 Les lésions intimes	26
1-2 Les lésions plexiformes	27
1-3. L'hypertrophie de la média	27
2- Altération de la prolifération et de la survie cellulaire	28
2-1 Les facteurs de croissances	29
2-1-1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	29
2-1-2 Ténascine-C	31
2-1-3 Fibroblast Growth Factor (FGF)	31
2-1-4 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	32
2-1-5. Transforming Growth Factor (TGF) and Bone Morphogenetic Protein (BMP)	33
2-2 La sérotonine	34
3- Altération des voies de signalisation régulées par le récepteur BMPRII	35
4- La transition endothélio-mésenchymateuse	36
5- Epissage alternatif de BMPRII	39
6- Altération du tonus vasculaire pulmonaire	41
6-1 Facteurs vasoconstricteurs	41
6-1-1 Le Thromboxane A2	41
6-1-2 Endothéline-1	42
6-2 Facteurs vasodilatateurs	43
6-2-1 La voie du monoxyde d'azote (NO)	43
6-2-2 Les prostacyclines	46
6-3 Autres effets des facteurs vasoactifs	46
7- Inflammation	47
7-1 Observations histopathologiques de l'inflammation dans l'HTAP	47
7-2 Cytokines et chimiokines	48
7-3 Auto-immunité et HTAP	50
7-4 Agents immunosuppresseurs dans l'HTAP	50
8- Défaillance cardiaque droite	51
CHAPITRE 5 : Traitements de l'HTAP	54
1-1 Les analogues de la prostacycline	54
1-2 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1	55
1-2 Les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5	55
1-3 L'activateur de guanylate cyclase soluble (GCs)	56
1-4 Les inhibiteurs des canaux calciques	57

1-5 Molécules en essais cliniques	57
2- Traitements de support non spécifiques de l'HTAP.....	59
2-1 Les anticoagulants oraux.....	59
2-2 Les diurétiques	59
2-3 L'oxygénothérapie.....	59
CHAPITRE 6 : Les modèles animaux d'hypertension artérielle pulmonaire (HTP)	60
1- Modèles toxiques	60
1-1 Le modèle d'HTP induite chez le rat par exposition à la monocrotaline	60
1-2 Le modèle d'HTP induite chez le rongeur (rat et souris) par hypoxie chronique	61
1-3 Le modèle d'HTP induite chez le rongeur par l'hypoxie + Sugén 5416 (SuHx)	61
1-4 Autres modèles d'HTP expérimentaux	62
2- Modèles génétiques.....	64
2-1 Les modèles de souris génétiquement modifiées	64
2-1-1. Les souris génétiquement modifiées pour le gène <i>Bmpr2</i>	64
2-2 Les modèles de rat génétiquement modifiés	66
2-2-1 Les rats génétiquement modifiés sur le gène <i>Bmpr2</i>	66
CHAPITRE 7 : La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO).....	68
1- Définition de la MVO.....	68
2- Classification de la MVO.....	69
3- Epidémiologie de la MVO.....	69
4- Diagnostic de la MVO.....	70
CHAPITRE 8 : Génétique de la MVO	72
1- Le gène <i>EIF2AK4</i>	72
1-1 Les mutations du gène <i>EIF2AK4</i>	72
1-2 GCN2 et la voie de la RIS	72
1-3 Relation structure-fonction de la protéine GCN2	75
CHAPITRE 10 : Physiopathologie de la MVO.....	77
1- Histologie de la MVOP	78
1-1 Lésions artérielles.....	78
1-2 Lésions veineuses.....	78
1-3 Lésions des capillaires pulmonaires.....	78
2- Pathogénèse moléculaire de la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO).....	79
CHAPITRE 11 : Traitements de la MVO	81
1- Traitements spécifiques de la MVO	81

2- Traitements de support non spécifiques de la MVO	81
CHAPITRE 12 : Les modèles animaux de maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO).....	82
1- Modèles toxiques	82
2- Modèles génétiques.....	83
Matériels et Méthodes.....	85
1- Caractérisation d'un modèle de MVO chimioinduite chez la rate.....	85
2- Echocardiographie cardiaque	85
3- Mesures hémodynamiques par cathétérisme cardiaque droit	86
4- Prélèvement des poumons de rats	86
5- Mesure de l'hypertrophie cardiaque droite	87
6- Patients.....	87
7- Prélèvements	87
8- Isolement des Lymphocytes T CD4 ⁺	88
9- Isolement des cellules endothéliales pulmonaires humaines	88
Etudes cellulaires et moléculaires	89
1- Etude de l'expression génique	89
1-1 Extraction des ARNs	89
1-2 Transcription Inverse	90
1-3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par la technologie SybrGreen.....	90
1-4 qPCR Array.....	91
2- Etude de l'expression protéique	93
3- Etude des canaux potassiques par patch clamp	96
Exposé des travaux.....	97
Projet 1 :.....	97
Caractérisation du modèle de rat injecté à la Mitomycine C : Comparaison du modèle expérimental et de la MVO humaine	97
1- Rationnel	97
2- Objectif de l'étude.....	98
3- Méthodes	98
4- Résultats.....	99
5-Discussion.....	102
6- Conclusion	104
7- Perspectives	104
7-1 Etude de la perte d'activation de la voie BMP au profit de la voie du TGF-β..	105
7-2 Etude du lien moléculaire entre GCN2 et la voie du BMP.....	106
8- Publication.....	108

Projet 2:.....	169
Epissage Alternatif de BMPR2 : Implication du Variant B dans le développement de l'HTAP	169
1- Rationnel	169
2- Objectifs de l'étude	170
3- Méthodes	170
4- Résultats.....	171
5- Discussion.....	172
6- Conclusion	175
7- Perspectives	175
8- Publication.....	177
Conclusion générale	202
Références Bibliographiques.....	204

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Frédéric PERROS, de m'avoir accueilli dans son équipe. Il m'a offert l'opportunité de travailler sur de nombreux sujets ce qui m'a permis de développer mes connaissances scientifiques ainsi qu'une grande autonomie.

Mes remerciements vont également au Pr Marc HUMBERT, pour l'honneur qu'il me fait d'évaluer et de présider le jury de ma thèse. Je remercie également le Dr Christelle GUIBERT et le Pr Anh Tuan DINH-XUAN d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. J'associe à ces remerciements le Pr Serge ADNOT et le Pr Luc MOUTHON pour leur participation au jury en qualité d'examineurs et pour le temps consacré à la lecture de mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Hélène LE RIBEUZ (alias « La Princesse ») pour ces deux dernières années passées ensemble. Tu as su supporter ma musique exotique, mon humeur (parfois difficile) et la bonne odeur de fumée de cigarette dans la voiture lorsque c'était trop difficile pour toi de marcher 10 minutes pour aller à la gare RER. Merci pour toutes les bonnes tranches de rigolade et les bonnes bières qu'on a pu partager. Bon courage pour ta dernière année de thèse, je n'ai aucun doute sur tes capacités à la mener à bien. J'espère qu'on pourra se revoir dans le futur.

Je tiens à remercier également le Dr. Mélanie LAMBERT pour ces années à travailler côte à côte. Tu m'as appris beaucoup de choses, j'ai passé beaucoup de bons moments avec toi. Cette complicité qu'on avait, elle va me manquer sans aucun doute. Je me souviens avoir passé notre temps à se chambrer sur le choix de la musique, sur mon rythme de travail ou sur ma manière de travailler. Je ne parlerai pas des retours de week-end ou tu voulais absolument TOUT savoir. Tout ça c'était génial. Je te souhaite beaucoup de réussite dans ton futur ainsi que beaucoup de bonheur.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe avec laquelle j'ai travaillé pendant ces 3 années. Merci à Véronique CAPUANO pour ton aide technique et intellectuelle précieuse ainsi que ta qualité d'écoute. Merci à Angèle BOËT, ton (gros) grain de folie apporte beaucoup de joie les

peu de temps ou tu passes nous voir, et merci pour les échos, c'était chiant mais marrant en même temps.

Merci à tous mes stagiaires que j'ai pu encadrer durant ma thèse, j'ai beaucoup appris durant vos passages respectifs. Merci tout particulièrement à Maria CALLEJO ARRANZ et Julien CALIEZ qui sont devenus mes amis.

Merci également à Yann RUCHON, Florence LECERF, Fabrice ANTIGNY pour votre aide et merci pour tous les bons moments partagés, votre écoute et votre bonne humeur. Merci Yvonne DUTHEIL pour ta bonne humeur et ton aide sur les commandes ; je te prie de m'excuser pour les (nombreuses) erreurs que j'ai pu commettre. Merci à Maria VINHAS pour ton aide pour la culture cellulaire. Et merci à Firmin AKOUMIA et Bahgat SOILHI, bon courage pour vos thèses respectives.

J'ai une pensée toute particulière pour Catherine RUCKER-MARTIN qui est malheureusement décédée depuis peu. Je tenais à te remercier pour tes conseils et ton écoute qui m'ont permis de mieux appréhender mon travail de recherche au sein du laboratoire.

Un grand merci à mes plus fidèles amis, Charles-Albert, Thomas, Adrien avec qui j'ai partagé tant de soirées à jouer qui m'ont particulièrement fait du bien. Merci à Coralyne et Claire pour votre soutien sans faille. Vous avez tous été un véritable point d'appui durant toute ma thèse. Je me sens chanceux de vous avoir près de moi, merci pour tout.

Je terminerai ces remerciements par mes parents Cécile et Philippe pour votre soutien sans pareil. Vous avez su m'aider sur tous les fronts et surtout quand j'en avais le plus besoin, j'espère que vous êtes fiers de moi. Je ne vais pas oublier mes deux sœurs, Elodie et Carole, merci à toutes les deux pour votre soutien, tous nos fous rires à la maison qui m'ont fait regagner confiance dans les moments difficiles de ma thèse.

Liste des travaux hors thèse

Travail 1: Trichloroethylene favors pulmonary endothelial permeability: implication for pulmonary veino-occlusive disease.

Auteurs : Caliez J*, Riou M*, **Manaud G**, Quatre-deniers M, Nakhleh M, Rucker-Martin C, Dorfmueller P, Lecerf F, Vinhas M, Humbert M, Montani D, Perros F.

Etat : Accepté à Pulmonary Circulation. 2020

Pulmonary Circulation. First Published 3 Feb 2020. doi:10.1177/2045894020907884

Travail 2: Vitamin D deficiency downregulates TASK-1 channels and induces pulmonary vascular dysfunction.

Auteurs: Callejo M, Mondejar-Parreño G, Morales-Cano D, Barreira B, Esquivel-Ruiz S, Olivencia MA, **Manaud G**, Perros F, Duarte J, Moreno L, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F.

Etat: Accepté à American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2020

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2020 Jul 29. doi: 10.1152/ajplung.00475.2019. Online ahead of print. PMID: 32726132.

Travail 3: Familial pulmonary arterial hypertension by KDR heterozygous loss of function.

Auteurs: Eyries M, Montani D, Girerd B, Favrolt N, Riou M, Faivre L, **Manaud G**, Perros F, Gräf S, Morrell NW, Humbert M, Soubrier F

Etat: Accepté à ERJ. 2020

Eur Respir J. 2020 Apr 3;55(4). pii: 1902165. doi: 10.1183/13993003.02165-2019. Print 2020 Apr. PMID: 31980491.

Travail 4: Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension.

Auteurs : Hautefort A, Mendes-Ferreira P, Sabourin J, **Manaud G**, Bertero T, Rucker-Martin C, Riou M, Adão R, Manoury B, Lambert M, Boet A, Lecerf F, Domergue V, Brás-Silva C, Gomez AM, Montani D, Girerd B, Humbert M, Antigny F, Perros F.

Etat: Accepté à Circulation. 2019

Circulation. 2019 Feb 12;139(7):932-948. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744. PMID: 30586714.

Travail 5: Smooth Muscle Phenotype in Idiopathic Pulmonary Hypertension: Hyper-Proliferative but not Cancerous.

Auteurs: Perros F, Sentenac P, Boulate D, **Manaud G**, Kotsimbos T, Lecerf F, Lamrani L, Fadel E, Mercier O, Londono-Vallejo A, Humbert M, Eddahibi S.

Etat: Accepté à IJMS. 2019

Int J Mol Sci. 2019 Jul 22;20(14). pii: E3575. doi: 10.3390/ijms20143575. PMID: 31336611

Travail 6: Axl is a Novel Modulator of Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 in Pulmonary Arterial Hypertension.

Auteurs: Novoyatleva T, Rai N, Kojonazarov B, Veeroju S, Ben-Batalla I, Caruso P, Shihan M, Presser N, Götz E, Lepper C, **Manaud G**, Perros F, Gall H, Ghofrani H.A, Weissmann N, Wharton J, Wilkins M, Upton P, Loges S, Morrell N, Seeger W, Schermuly R.T

Etat: Soumis à Nature Communications. 2020

Travail 7: Extracellular matrix degradation pathways and fatty acid metabolism regulate distinct pulmonary vascular cell types in Pulmonary Arterial Hypertension.

Auteurs: Mumby S; Perros F; Hui C; Xu B; Xu W; Elyasigomari V; Hautefort A; **Manaud G**; Humbert M; Chung F; Wort J; Adcock I

Etat: Soumis à Pulmonary Circulation. 2020

Liste des travaux

Travail 1: Comparison of human and experimental pulmonary veno-occlusive disease.

Auteurs: Manaud G*, Nossent EJ*, Lambert M, Ghigna MR, Vinhas M, Ranchoux B, Dumas SJ, Courboulin A, Girerd B, Soubrier F, Bignard J, Claude O, Lecerf F, Hautefort A, Florio M, Sun B, Nadaud S, Verleden SE, Anegon I, Rémy S, Bogaard HJ, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Grünberg K, Humbert M, Montani D, Dorfmueller P, Antigny F, Perros F

Etat: Accepté à AJRCMB. 2020

Am J Respir Cell Mol Biol. 2020 Mar 25. doi: 10.1165/rcmb.2019-0015OC. [Epub ahead of print] PMID: 32209028

Travail 2: BMPR2 alternative splicing in pulmonary endothelial cells is involved in the pathobiology of heritable PAH

Auteurs: Manaud G, Chesné J, Hautefort A, Preussner J, Pullamsetti SS, Looso M, Girerd B, Deleuze JF, Seeger W, Fadel E, Simonneau G, Montani D, Humbert M, Perros F

Etat: En préparation

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du poumon humain, anatomie des sacs alvéolaires en contact avec les capillaires pulmonaires.

Figure 2 : Circulation pulmonaire et systémique chez l'Homme.

Figure 3 : Composition des feuillets cellulaires qui forment la paroi artérielle.

Figure 4 : Classification des examens de diagnostic de l'HTAP.

Figure 5 : Schéma de diagnostic de l'HTAP par mesure de la PAPm par cathétérisme cardiaque droit.

Figure 6 : Répartition des mutations du gène *BMPR2* identifiées chez les patients atteints d'HTAP.

Figure 7 : Schéma de l'interaction entre les récepteurs membranaires de type I et de type II de la superfamille du TGF- β .

Figure 8 : Schéma des interactions entre les BMPs et les complexes hétéro-tétramériques de récepteurs de surface de type I et II ainsi que les voies de signalisation pouvant être activées par ces complexes.

Figure 9 : Schéma et effet des voies de signalisation non canonique (SMAD indépendant) activées par le complexe BMPRI-BMPRII stimulé par les BMPs (Adapté de Gâmez et al, 2013).

Figure 10 : Schéma des deux voies de signalisation majeures indépendantes des SMAD (d'après Thielen et al, 2019).

Figure 11 : Coloration Trichrome de lésions intimes retrouvées chez les patients HTAP.

Figure 12 : Coloration Hématoxyline-Eosine de lésions plexiformes retrouvées chez les patients HTAP.

Figure 13 : Coloration Hématoxyline-Eosine d'hypertrophies médiales chez les patients HTAP.

Figure 14 : Schéma de structure des différents récepteurs à activité tyrosine kinase des facteurs de croissance suivants : EGF, IGF, NGF, PDGF, FGF, VEGF et Eph.

Figure 15 : Schéma de l'hypothèse de sélection par l'apoptose dans le modèle SuHx (d'après Sakao, 2005).

Figure 16 : Schéma du mécanisme de transactivation des récepteurs PDGFR et TrkB par la sérotonine (d'après Kruk et al, 2013).

Figure 17 : Schéma représentant la voie de production et de dégradation de la sérotonine chez l'Homme.

Figure 18 : Schéma représentant la voie de signalisation responsable de l'effet pro-prolifératif de la sérotonine sur les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires.

Figure 19 : Schéma représentant des mécanismes et les étapes de la transition endothélio-mésenchymateuses dans l'HTAP.

Figure 20 : Schéma représentatif de la voie de signalisation de la forme courte de BMPR2 (Variant B).

Figure 21 : Images d'immunofluorescence de la F-Actine de cellules endothéliales vasculaires de souris contrôles et mutées dans la partie codante pour la queue cytoplasmique (BMPR2-R899X) de BMPR2.

Figure 22 : Voie de production de la prostacycline et du thromboxane A2.

Figure 23 : Voies de signalisation de l'endothéline dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires.

Figure 24 : Voie de production du NO.

Figure 25 : Spécificité des phosphodiésterases pour l'AMPc et/ou le GMPc ainsi que leurs inhibiteurs connus.

Figure 26 : Cibles moléculaire et traitements actuels de l'HTAP.

Figure 27 : Schéma récapitulant les effets moléculaires de l'époprostenol chez l'Homme (d'après Sitbon et Vonk Noordegraaf, 2017).

Figure 28 : Schéma des effets moléculaires de l'inhibition des PDEs sur les cellules musculaires lisses vasculaires (d'après Barnett et Machado, 2006).

Figure 29 : Schéma détaillé du processus d'angiogenèse.

Figure 31 : Localisation et conséquences des mutations récessives sur le gène *EIF2AK4* chez les patients atteints de forme familiale de MVO (D'après Eyries et al, 2014).

Figure 32 : Voie de signalisation activée par GCN2 lors d'une carence en acide aminés.

Figure 33 : Schéma de la voie de signalisation de la réponse intégrée au stress (RIS).

Figure 34 : Schéma de l'interaction entre mTOR et GCN2 conditionnée par la disponibilité en acides aminés dans la cellule.

Figure 35 : Schéma de l'interaction entre GCN1 et GCN2 sur son domaine RWD (d'après Casthilo et al, 2014).

Figure 36 : Schéma des domaines protéiques de la protéine GCN2.

Figure 37 : Modélisation structurale de la protéine GCN2 obtenue par cristallographie.

Figure 38 : Schéma des lésions vasculaires pulmonaires caractéristiques de la MVOP.

Figure 39 : Lésions artérielles caractéristiques des patients MVOP.

Figure 40 : Marquage des lésions veineuses caractéristiques de la MVOP.

Figure 41 : Marquage de foyers d'hémangiomatose capillaire pulmonaire chez un patient MVOP.

Figure 42 : Schéma des étapes d'isolation de LTCD4+ par le kit RosetteSep Human CD4+ T Cell Enrichment Cocktail.

Figure 43 : Schéma de la méthode de PCR quantitative par Sybr Green.

Figure 44 : Expression de l'ARNm de Fkbp1a dans la semaine 3 du modèle de MVOP induite chez le rat par l'exposition à la MMC.

Figure 45 : Modèle présentant le mécanisme de régulation des BMPs par la Chordine.

Figure 46 : Schéma de l'implication de la protéine Tctex-1 dans la signalisation de la voie du BMP.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification clinique des hypertensions pulmonaires (Simonneau et al, 2019).

Tableau 2 : Liste des médicaments ou toxiques connus et supposés responsables d'HTAP induite (Simonneau et al., 2019).

Tableau 3 : Liste des gènes mutés connus dans l'HTAP (Garcia-Rivas et al., 2017).

Tableau 4 : Expression du VEGF dans différentes formes d'hypertension artérielle pulmonaire humaine (D'après Voelkel et Gomez-Arroyo. 2014).

Tableau 5 : Expression du VEGF et de ses récepteurs dans différents modèles animaux d'hypertension pulmonaire (d'après Voelkel et Gomez-Arroyo, 2014).

Tableau 6 : Liste récapitulative des modèles d'animaux transgéniques portant une mutation dans la voie BMPR2 (D'après Guignabert et al, 2017).

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques clés permettant de distinguer les HTAP des MVO (d'après Montani et al, 2016).

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques des patients français traités à la mitomycine C et diagnostiqués avec une MVO.

Tableau 9 : Plan de plaque de la qPCR Array regroupant les gènes impliqués dans la voie de la RIS chez l'Homme.

Tableau 10 : Plan de plaque de la qPCR Array regroupant les gènes impliqués dans la voie du BMP chez l'Homme.

Tableau 11 : Tableau récapitulant les anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western Blot.

Liste des abréviations

α -SMA : Alpha Smooth Muscle Actin
ABCC8 : ATP Binding Cassette Channel Member 8
ACVR2 : Activin A Receptor Type 2
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : Acide Désoxyribonucléique génomique
ALK1 : Activin receptor-Like Kinase 1
AMP : Adénosine Mono Phosphate
AMPc : Adénosine Mono Phosphate Cyclique
APLNR : Apelin Receptor
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
ASNS : Asparagine Synthétase
ATP : Adénosine Triphosphate
ATF4 : Activating Transcription Factor 4
BCA : Bicinchoninic acid Assay
BCL2L11 : BCL-2 like 11
BMPR1 : Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type 1
BMPR2 : Bone Morphogenetic Protein Receptor, Type 2
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BNP : Natriuretic Peptide B
BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
BRD4 : Bromodomain Containing 4
BSA : Bovine Serum Albumin
Ca²⁺ : Ion Calcium
CAT1 : Solute Carrier Family 7 Member 1
CAV1 : Caveolin-1
CCL : C-C Motif Chemokine Ligand
CE : Cellule Endothéliale
CD : Cellule Dendritique
CHOP (DDIT3) : DNA Damage Inducible Transcript 3

CHRD : Chordine
CO₂ : Dioxyde de Carbone
Col : Collagène
COX : Cyclo-Oxygénase
CP : Cyclophosphamide
CXC3CL1 : C-X3-C Motif Chemokine Ligand
DAG : Di-Acyl Glycérol
DLCO : Diffusion Libre du CO
DYNLT1 : Dynein Light Chain Tctex-Type 1
ECG : Electro-Cardiogramme
ECL : Enhanced Chemiluminescent
EDN1 : Endothéline 1
EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EIF2A : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A
EIF2AK4 : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4
EMT : Epithelial Mesenchymal Transition
ENG : Endoglin
eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase
ER : Endoplasmic Reticulum
ET : Endothéline
FGF : Fibroblast Growth Factor
FIH : Asparagine Hydroxylase Factor Inhibiting
GADD34 : Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible 34
GC : Guanylate Cyclase
GCN1 : General Control Nonderepressible 1
GCN2 : General Control Nonderepressible 2
GDF-2 : Growth Differentiation Factor 2
GMP : Guanosine Mono Phosphate
GMPc : Guanosine Monophosphate Cyclique
GTP : Guanosine Tri Phosphate
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCP : Hémangiomatose Capillaire Pulmonaire
HHT : Télangiectasie Hemorragique Héritaire
HMGA1 : High Mobility Group AT-Hook 1
HO-1 : Hème Oxygénase 1
HTP : Hypertension Pulmonaire
HTP-TEC : Hypertension Pulmonaire Thrombo-Embolique Chronique
HTAP : Hypertension Artérielle Pulmonaire
HRI : Heme-Regulated Inhibitor
HVD : Hypertrophie Ventriculaire Droite
ID1 : Inhibitor of DNA Binding 1
IL : Interleukine
RIS : Réponse Intégrée au Stress
IV : Intra-veineuse
JNK : Janus Kinase
KCNA5 : Potassium Voltage Gated Subfamily A Member 5
KCNJ11 : Potassium Inward Rectifier Channel Subfamily J Member 11
KCNK3 : Potassium channel subfamily K member 3
KDR : Kinase Insert Domain Receptor (VEGFR2)
KO : Knock-out
LB : Lymphocytes B
LC/MS : Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
LIMK1 : LIM Domain Kinase 1
LT : Lymphocytes T
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCT : Monocrotaline
MEC : Matrice Extracellulaire
mi-ARN : micro-ARN
MMC : Mitomycine C
mmHg : Millimètre de mercure
mTOR : Molecular Target of Rapamycin
MVOP : Maladie Veino-Occlusive Pulmonaire
MYOD : Myogenic Differentiation 1

NF-κB : Nuclear Factor Kappa B
NFAT : Nuclear Factor Of Activated T Cells
NGF : Nerve Growth Factor
NKx2.1 : NK2 Homeobox 1
NO : Nitric Oxyde
NOS3 : Nitric Oxyde Synthase 3
NOTCH3 : Notch Receptor 3
NOX : NAPDPH Oxydase 1
NRF2 : Nuclear Factor, Erythroid 2 Related Factor 2
NWD : NACHT/WD40-repeat domain
O₂ : Dioxygène
OCT : Optimal Cutting Temperature
OD : Oreillette Droite
OG : Oreillette Gauche
PAPm : Pression Artérielle Pulmonaire Moyenne
PAPO : Pression Artérielle Pulmonaire d'Occlusion
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCP : Pression Capillaire Pulmonaire
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDE : Phosphodiesterase
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDK : Pyruvate Deshydrogénase Kinase
PERK : PKR-like ER kinase
PGH2 : Prostaglandine H2
PGI2 : Prostaglandine I2
PHD : Prolyl Hydroxylase Domain
PHS : Perlecan Héparane Sulfate
PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PIP2 : Phosphatidyl Inositol biphosphate
PIP3 : Phosphatidyl Inositol triphosphate
PKR : Protein Kinase R
PLC : Phospholipase C
PMAIP1 : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
QPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction
RPL7 : Ribosomal Protein L7

RPM : Rotation par minutes
RVP : Résistances Vasculaires Pulmonaires
SC : Sous-cutané
Si-ARN : Silenced ARN
SIRT3 : Sirtuin 3
SMAD1 : Small Mothers Against
Decapentaplegic Homolog 1
SMAD9 : Small Mothers Against
Decapentaplegic Homolog 9
SNAT2 : System N Amino Acid Transporter
2
SLUG (SNAI2) : Snail Family Transcriptional
Repressor 2
SOX17 : SRY-Related HMG-Box
Transcription Factor 17
SQSTM1 : Sequestosome 1
SRSF2 : Serine and Arginine Rich Splicing
Factor 2
STAT : Signal Transducer and Activator of
Transcription
SU5416 : Sugén
SuHx : Sugén Hypoxie

SVF : Sérum de Veau Foetal
TLR4 : Toll Like Receptor 4
TBS-T : Tris Buffered Saline- Tween
TBX4 : T-Box Transcription Factor 4
TBX-20 : T-Box Transcription Factor 20
THBS1 (TSP-1) : Thrombospondin
TOPBP1 : DNA Topoisomerase II Binding
Protein 1
TRAF6 : TNF Receptor Associated Factor 6
TRB3 : Tribbles Pseudokinase 3
TXA2 : Thromboxane A2
TWIST-1 : Twist Family BHLH Transcription
Factor 1
VE-Cad : Vascular-Endothelial Cadherin
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VD : Ventricule Droit
VG : Ventricule Gauche
VIH : Virus de l'Immunodéficience
Humaine
vWF : Von Willebrand Factor
5-HT : Sérotonine, encore appelée 5-
hydroxytryptamine

Introduction

CHAPITRE 1 : Physiologie Pulmonaire

1- Le poumon

Le poumon est un organe pair essentiel de l'appareil respiratoire situé dans la cage thoracique. Il permet les échanges gazeux au niveau du sang, notamment de l'oxygène et du dioxyde de carbone (CO₂). L'oxygène est essentiel au métabolisme cellulaire. L'oxygène est capté alors que le dioxyde de carbone qui est toxique doit être évacué. Chez l'Homme, il existe deux poumons, le gauche et le droit situés à l'intérieur du thorax dans les cavités pleurales séparées l'une de l'autre par le médiastin. A travers la plèvre qui recouvre l'organe, chaque poumon est en rapport avec le diaphragme et à la cage thoracique (Figure 1). Le poumon droit est divisé en 3 lobes (supérieur, inférieur et moyen), le gauche est lui divisé en 2 lobes (supérieur et inférieur).

C'est à travers les alvéoles qui forment des petits sacs terminant les voies ventilatoires que se produisent les échanges gazeux. Ces alvéoles sont formées d'une paroi très fine (0,2µm) et sont apposées aux capillaires pulmonaires (Figure 1). La surface totale destinée aux échanges gazeux est estimée à 140m². Avant d'arriver dans les alvéoles, l'air inhalé est réchauffé puis débarrassé des corps étrangers grâce au mucus qui tapisse les voies ventilatoires. L'air emprunte les canaux qui sont subdivisés 20 à 25 fois depuis la trachée jusqu'aux alvéoles.

Outre les échanges gazeux, les poumons participent à d'autres fonctions, comme la régulation du métabolisme acido-basique ainsi qu'un rôle de filtration du sang en éliminant les petits caillots.

Concernant l'origine embryologique du poumon, cet organe prend son origine dans une excroissance du pharynx chez les vertébrés.

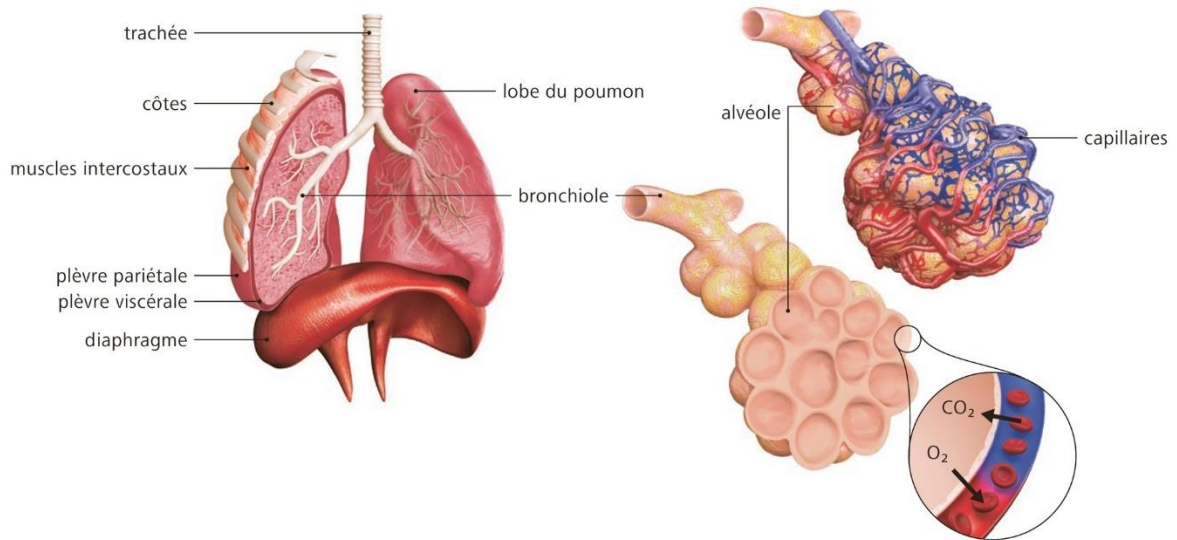


Figure 1 : Anatomie du poumon humain, anatomie des sacs alvéolaires en contact avec les capillaires pulmonaires.

2- La circulation pulmonaire

Chez l'Homme ainsi que dans de nombreux organismes vivants, il existe deux circulations sanguines avec des fonctions distinctes : la circulation pulmonaire et la circulation systémique (Figure 2). La circulation pulmonaire commence par une arrivée du sang pauvre en oxygène depuis le ventricule droit par l'intermédiaire de l'artère pulmonaire, puis les artérioles et pour finir jusqu'au lit capillaire pulmonaire. Dans le poumon, le contact étroit entre les capillaires sanguins et les alvéoles permet des échanges gazeux optimaux pour réoxygéner le sang. Le sang, débarrassé du CO_2 et riche en oxygène va se déverser dans l'oreillette gauche via les veinules et veines pulmonaires. Une fois dans l'oreillette gauche, le sang est amené jusque dans le ventricule gauche puis éjecté dans l'aorte afin d'être distribué dans tous les organes pour apporter l'oxygène nécessaire au fonctionnement de toutes les cellules du corps. Une fois cet oxygène consommé, le sang à nouveau appauvri, arrive dans l'oreillette droite par les veines caves supérieures et inférieures et le cycle d'oxygénation se répète.

La circulation pulmonaire est aussi appelée « petite circulation ». Contrairement à la circulation systémique, la circulation pulmonaire est un système à basse pression et faibles résistances vasculaires, ce qui permet de réaliser efficacement les échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires. L'oxygénation du tissu pulmonaire (bronches et plèvre) est assurée par la circulation systémique pulmonaire également appelée circulation bronchique.

Les artères (pulmonaires et systémiques) sont composées de 3 couches distinctes, de la plus interne à la plus externe : l'intima, la média et l'adventice (Figure 3).

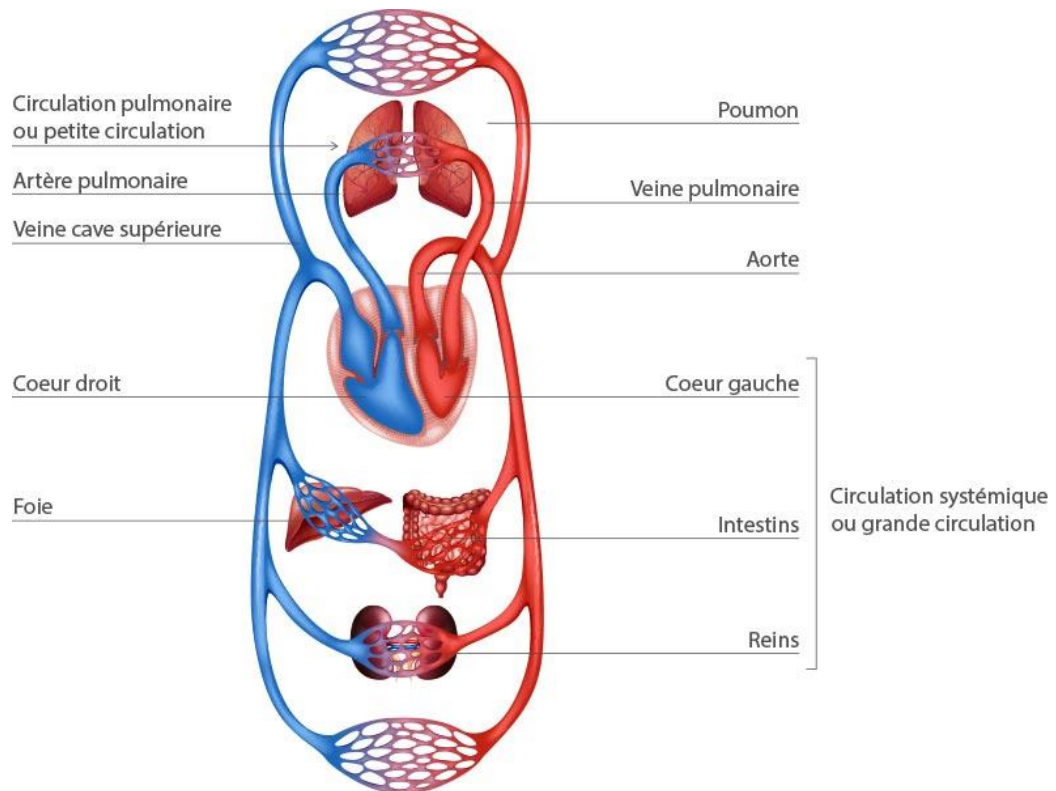


Figure 2 : Circulation pulmonaire et systémique chez l'Homme.

L'intima est la couche la plus interne, directement en contact avec le sang. C'est la plus fine des 3 couches qui composent la paroi artérielle. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) aussi appelée endothélium, qui forme une barrière étanche avec des propriétés de thrombo-résistances et une fonction immunitaire importante. L'endothélium est en contact avec une lame basale, une limitante élastique interne en plus d'une fine couche de tissu conjonctif.

La média est la couche intermédiaire dans la paroi des artères. Elle représente la partie principale de l'artère et c'est également la couche la plus épaisse. La média est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses qui sont empilées de façon concentrique et forment ainsi plusieurs couches. Les cellules musculaires lisses ayant une fonction contractile, elles sont nécessaires à la modification du calibre de l'artère (taille et diamètre de la lumière) et peuvent donc modifier par conséquent la pression sanguine par contraction ou dilatation. La média est séparée de la couche la plus externe par une couche de fibres élastiques. Enfin, l'adventice est la dernière couche de la paroi artérielle et par conséquent, la plus externe. Elle est essentiellement composée de tissu conjonctif riche en collagène, fibres élastiques et fibroblastes.

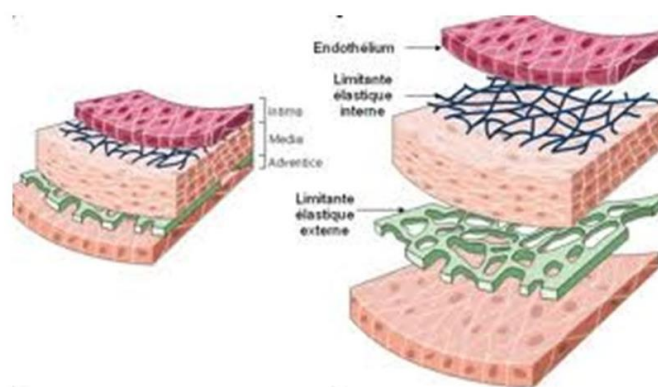


Figure 3 : Composition des feuillets cellulaires qui forment la paroi artérielle.

CHAPITRE 2 : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

1- Définition de l'HTAP

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardio-pulmonaire sévère. Elle est caractérisée par une augmentation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 20 mmHg au repos, des résistances artérielles pulmonaires supérieures à 3 Unités de Wood, et par une pression artérielle pulmonaire occluse (PAPO), reflet de la pression capillaire pulmonaire (PCP) inférieure ou égale à 15 mmHg (Simonneau et al., 2019). L'HTAP est caractérisée par une obstruction des artères pulmonaires de petit calibre (diamètre inférieur à 500 μm) conduisant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. L'élévation de la PAP aboutit à une hypertrophie cardiaque droite compensatrice puis à une défaillance cardiaque droite et à terme au décès du patient.

2- Classification de l'HTAP

Une classification clinique internationale des hypertensions pulmonaires (HTP) a été mise en place lors du 2nd congrès mondial de l'HTP en 1998. Cette classification a ensuite été régulièrement révisée, dont dernièrement en 2019 (Tableau 1). Bien que l'ensemble des HTP possède de nombreuses similitudes, elles sont regroupées suivant leurs caractéristiques cliniques, physiopathologiques, hémodynamiques et thérapeutiques. Il existe 5 groupes d'HTP :

- Les HTP du groupe 1 correspondent à l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Il existe différentes sous catégories d'HTAP regroupées selon leur étiologie :
 - L'HTAP idiopathique (HTAPi) correspondant à une forme sporadique de la maladie sans facteur de risque identifié.
 - L'HTAP est dite héritable (HTAPh) lorsque celle-ci est familiale et/ou lorsqu'une mutation est identifiée sur un gène de prédisposition à l'HTAP. Les HTAPh représentent environ 7% des HTAP. Des mutations dans les gènes *BMPR2* (*Bone Morphogenic Protein Receptor type 2*), *TBX4* (*T-box transcription factor 4*), *ALK1* (*Activin-like receptor kinase 1*), *ENG* (*Endoglin*), *SMAD-1* et *SMAD-9* (*SMAD family member 1 and member 9*), *CAV-1* (*Caveolin-1*), *KCNK3* (*Potassium Channel subfamily K member 3*) en encore *ABCC8* (*ATP binding cassette channel member 8*), entre autres, sont en cause.

- L'HTAP induite par un médicament ou une toxine tels que les anorexigènes, certains agents chimio-thérapeutiques ou encore les amphétamines et ses dérivés (Tableau 2).
- L'HTAP associée à d'autres pathologies telles que des connectivites ; une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), une hypertension portale, une cardiopathie congénitale ou encore une schistosomiase.
- Les HTAP dont les patients sont dits « bons répondeurs » aux inhibiteurs des canaux calciques.
- Les HTAP avec atteinte veineuse pulmonaire prédominante (Maladie Veino-Occlusive Pulmonaire (MVOP) et Hémangiomatose Capillaire Pulmonaire (HCP)).
- Le syndrome d'HTAP persistante du nouveau-né.
- Les HTP de groupes 2, 3 et 4 sont des HTP secondaires à d'autres pathologies identifiées
 - Les HTP du groupe 2 correspondent aux HTP secondaires à des pathologies du cœur gauche (malformations, insuffisances cardiaques ou atteintes valvulaires).
 - Les HTP du groupe 3 regroupent les HTP secondaires à des maladies pulmonaires (Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), emphysème ou mucoviscidose) et/ou une hypoxémie.
 - Les HTP du groupe du groupe 4 représentent les HTP thromboembolique chronique (HTP-TEC).
 - Les HTP du groupe 5 incluent les HTP dont les mécanismes sont multifactoriels et incertains telles que les maladies hématologiques, systémiques ou encore métaboliques (sarcoïdose, histiocytose ou lymphangiomyomatose).

- 1 PAH**
 - 1.1 Idiopathic PAH
 - 1.2 Heritable PAH
 - 1.3 Drug- and toxin-induced PAH (table 3)
 - 1.4 PAH associated with:
 - 1.4.1 Connective tissue disease
 - 1.4.2 HIV infection
 - 1.4.3 Portal hypertension
 - 1.4.4 Congenital heart disease
 - 1.4.5 Schistosomiasis
 - 1.5 PAH long-term responders to calcium channel blockers (table 4)
 - 1.6 PAH with overt features of venous/capillaries (PVOD/PCH) involvement (table 5)
 - 1.7 Persistent PH of the newborn syndrome
- 2 PH due to left heart disease**
 - 2.1 PH due to heart failure with preserved LVEF
 - 2.2 PH due to heart failure with reduced LVEF
 - 2.3 Valvular heart disease
 - 2.4 Congenital/acquired cardiovascular conditions leading to post-capillary PH
- 3 PH due to lung diseases and/or hypoxia**
 - 3.1 Obstructive lung disease
 - 3.2 Restrictive lung disease
 - 3.3 Other lung disease with mixed restrictive/obstructive pattern
 - 3.4 Hypoxia without lung disease
 - 3.5 Developmental lung disorders
- 4 PH due to pulmonary artery obstructions (table 6)**
 - 4.1 Chronic thromboembolic PH
 - 4.2 Other pulmonary artery obstructions
- 5 PH with unclear and/or multifactorial mechanisms (table 7)**
 - 5.1 Haematological disorders
 - 5.2 Systemic and metabolic disorders
 - 5.3 Others
 - 5.4 Complex congenital heart disease

Tableau 1 : Classification clinique des hypertensions pulmonaires (Simonneau et al, 2019).

Definite	Possible
Aminorex	Cocaine
Fenfluramine	Phenylpropanolamine
Dexfenfluramine	L-tryptophan
Benfluorex	St John's wort
Methamphetamines	Amphetamines
Dasatinib	Interferon- α and - β
Toxic rapeseed oil	Alkylating agents
	Bosutinib
	Direct-acting antiviral agents against hepatitis C virus
	Leflunomide
	Indirubin (Chinese herb Qing-Dai)

Tableau 2 : Liste des agents chimiques connus et supposés responsables d'HTAP induite (Simonneau et al., 2019).

3- Epidémiologie de l'HTAP

Dans le monde, la prévalence de l'HTAP idiopathique est estimée à environ 15 à 50 cas par million d'habitants (Lau et al., 2017). Cependant le diagnostic de cette maladie restant difficile, cette prévalence est certainement sous-estimée. L'âge moyen du diagnostic est autour de 50 à 65 ans pour les formes idiopathiques d'HTAP et plus basse chez les formes héréditaires d'HTAP compris entre 31 et 45 ans selon le registre Français (Humbert et al., 2006). Il y a une

prédominance féminine de la maladie ; les femmes sont plus de deux fois plus touchées que les hommes.

4- Diagnostic de l'HTAP

L'évaluation d'un patient suspecté d'une HTAP requiert une combinaison de tests qui incluent des examens physiques, écho-cardiographiques, d'imagerie, des tests fonctionnels ainsi qu'un cathétérisme du cœur droit (Figure 4) (Lai et al., 2014).

Premièrement, les symptômes classiques des patients sont essentiellement une fatigue à l'effort, une léthargie, des dyspnées. Ces symptômes sont les premiers indices d'une HTAP mais sont communs à un grand nombre de pathologies.

Par la suite, un examen physique, une radiographie de la poitrine et parfois un ECG sont des outils diagnostics qui vont permettre de confirmer ou non la suspicion d'une HTAP et d'évaluer la présence d'une pathologie cardiaque.

Ensuite, une échocardiographie est réalisée afin d'estimer plusieurs paramètres hémodynamiques (RVP, Taille VG/VD, Fonction systolique droite) et ainsi d'évaluer l'atteinte cardiaque droite du patient. Cependant, pour confirmer le diagnostic de l'HTAP, l'échocardiographie n'est pas suffisante, un cathétérisme cardiaque droit est nécessaire. Une augmentation de la PAPm au-delà de 20 mmHg et RVP > **3 unités de Wood** vont confirmer définitivement le diagnostic de l'HTAP (Figure 5).

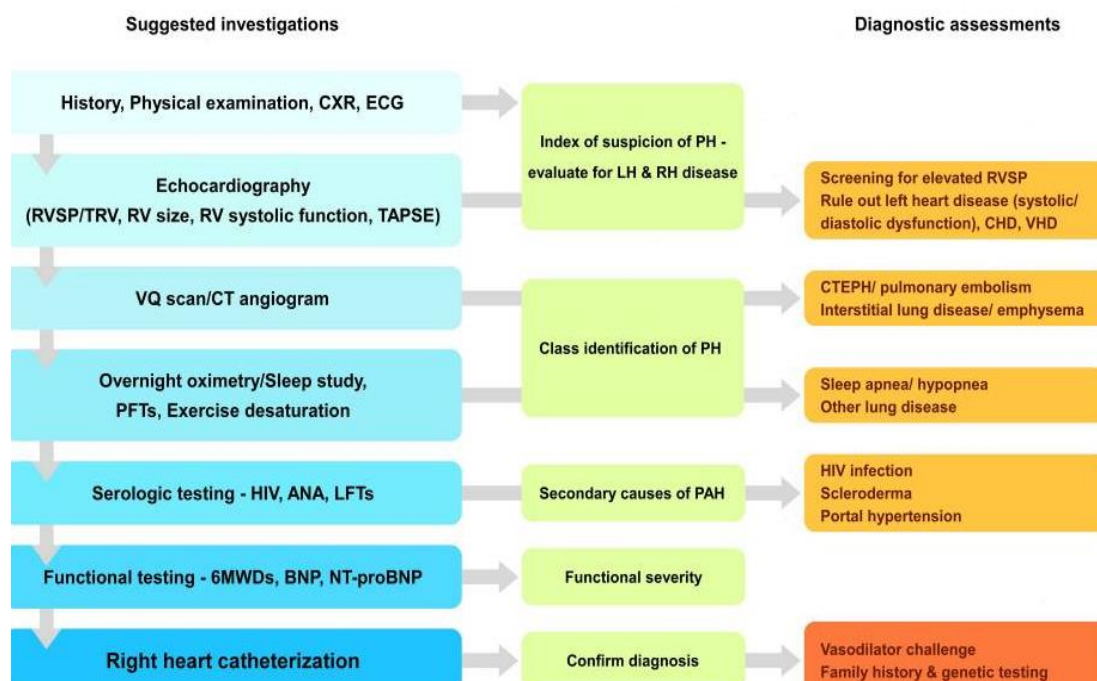


Figure 4 : Classification des examens de diagnostic de l'HTAP (Lai et al, 2014).

A ce stade, un sous-groupe de patient peut être caractérisé comme étant bon répondeur à des vasodilatateurs lorsque le monoxyde d'azote inhalé, l'adénosine ou la prostacycline intraveineuse permettent de diminuer la PAPm d'au moins 10 mmHg tout en étant inférieure à 40 mmHg avec un débit cardiaque normal. Ces patients pourront bénéficier d'un traitement prolongé aux inhibiteurs calciques (Sitbon et al., 1998).

En parallèle ou en amont, d'autres tests sont réalisés afin de déterminer la classe d'HTAP ainsi que le pronostic du patient. En effet, une angiographie peut être réalisée afin de diagnostiquer les patients atteints de HTP-TEC, de maladie pulmonaire comme les maladies interstitielles ou un emphysème.

Les patients atteints d'apnée du sommeil ou d'autres pathologies pulmonaires peuvent être caractérisés via des examens de type oxymétrie, étude du sommeil ou des exercices de désaturation. Les patients atteints d'une HTAP secondaire à une infection seront diagnostiqués après des tests sérologiques dirigés contre le VIH entre autres.

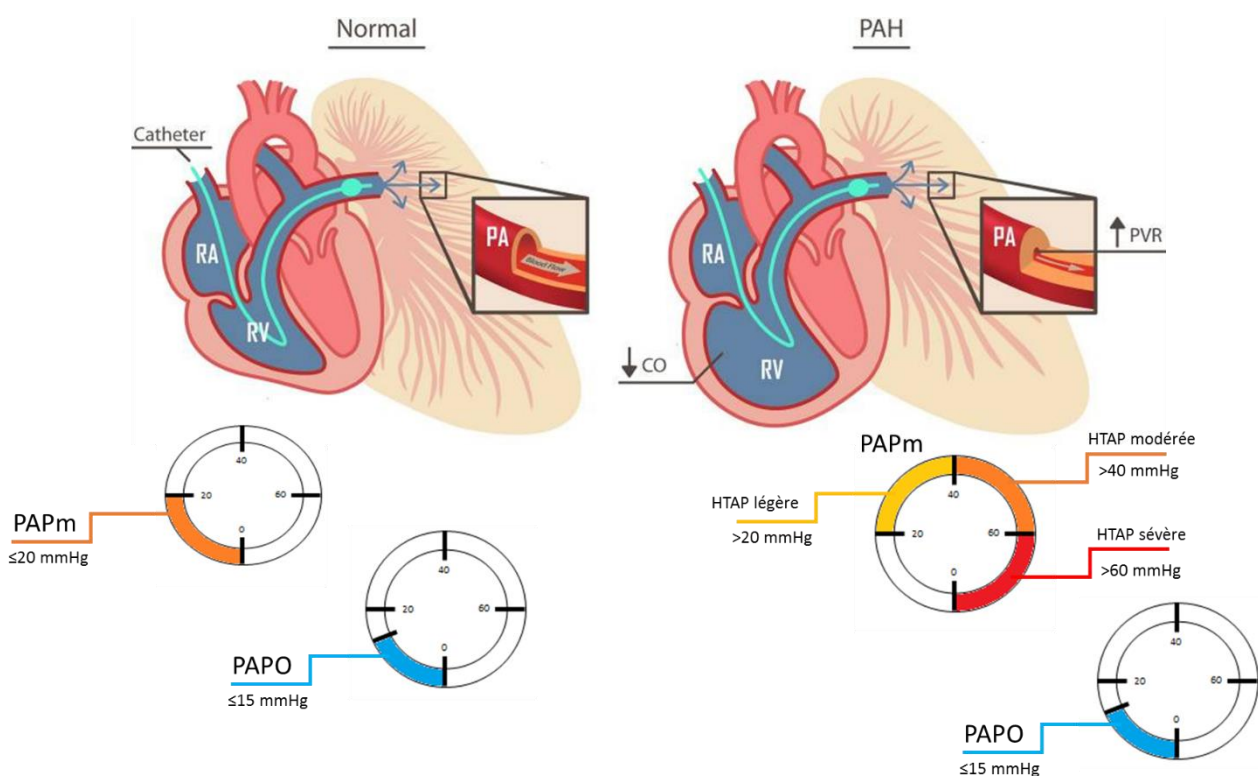


Figure 5: Schéma de diagnostic de l'HTAP par mesure de la PAPm par cathétérisme cardiaque droit (d'après Lai et al, 2014).

Enfin, la sévérité de la dysfonction cardiaque peut être déterminée de plusieurs manières :

- Par dosage de marqueurs d'insuffisance cardiaque comme les BNP ou les pro-NT BNP (Hormone sécrétée par les cardiomyocytes lors d'une surcharge de volume et de pression dans l'oreillette et le ventricule droit).
- Par un test de marche de 6 minutes, qui corrèle la distance réalisée par le patient à la sévérité de l'atteinte cardiaque (600-700 m correspond à un patient non malade, 300-350 m correspond à un mauvais pronostic et <165m reflète une limitation extrêmement sévère).
- Par échocardiographie Doppler, qui apporte de façon non invasive un suivi de la fonction cardiaque et permet d'observer la réponse au traitement.

CHAPITRE 3 : Génétique de l'HTAP

Des mutations dans plusieurs gènes ont été retrouvées chez des patients atteints d'HTAP sporadique, familiale ou liée à la prise de médicaments. Le gène *BMPR2* (*Bone morphogenetic protein receptor 2*) est le gène principal de prédisposition à l'HTAP héritable. Aujourd'hui, environ une vingtaine de gènes ont été identifiés comme présentant des mutations chez des patients diagnostiqués avec une HTAP (Garcia-Rivas et al., 2017) (Tableau 3).

Symbole	Nom
<i>ABCC8</i>	ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8
<i>ACVLR1</i>	Activin A receptor like type 1
<i>ATP13A3</i>	ATPase 13A3
<i>BMPR1B</i>	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B
<i>BMPR2</i>	Bone morphogenetic protein receptor, type II
<i>CAV1</i>	Caveolin 1
<i>EDN1</i>	Endothelin 1
<i>EIF2AK4</i>	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4
<i>ENG</i>	Endoglin
<i>GDF2</i>	Growth Differentiation Factor 2
<i>KCNA5</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 5
<i>KCNK3</i>	Potassium two pore domain channel subfamily K member 3
<i>KDR</i>	Kinase Insert Domain Receptor
<i>NOTCH3</i>	Notch 3
<i>SMAD1</i>	Small Mother Against Decapentaplegic Homologues family member 1
<i>SMAD4</i>	Small Mother Against Decapentaplegic Homologues family member 4
<i>SMAD5</i>	Small Mother Against Decapentaplegic Homologues family member 5
<i>SMAD9</i>	Small Mother Against Decapentaplegic Homologues family member 9
<i>SOX17</i>	SRY-Related HMG-Box Transcription Factor 17
<i>TBX4</i>	T-box transcription factor 4
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1
<i>TOPBP1</i>	Topoisomerase (DNA) II binding protein 1

Tableau 3 : Liste des gènes mutés connus dans l'HTAP (Garcia-Rivas et al., 2017).

Un grand nombre de ces gènes (*ACVLR1*, *BMPR1B*, *BMPR2*, *CAV1*, *ENG*, *GDF2*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD5* et *SMAD9*) codent pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation BMPRII, ce qui fait de cette voie un axe majeur dans la genèse et le développement de l'HTAP.

1- Le gène *BMPR2*

1-1 Les mutations du gène *BMPR2*

Le gène *BMPR2* est le gène principal de prédisposition à l'HTAP. En effet, des mutations dans ce gène sont retrouvées dans 70% des HTAP héréditaires et 3,5 à 40% des HTAP initialement considérées comme idiopathiques possèdent une mutation dans le gène *BMPR2* (Girerd et al., 2016). Ce sont des mutations autosomiques dominantes avec une pénétrance incomplète. Il est estimé que 14% des hommes et 42% des femmes porteurs de mutation du gène *BMPR2* développeront une HTAP héréditaire (Larkin et al., 2012). Il existe plus de 384 mutations actuellement identifiées sur le gène *BMPR2*. Ces mutations peuvent être des mutations faux-sens, non-sens ou des grands réarrangements (délétions, duplications) (Tielemans et al., 2019). Ces mutations sont réparties sur l'ensemble du gène *BMPR2* à l'exception du dernier exon, l'exon 13 (Figure 6).

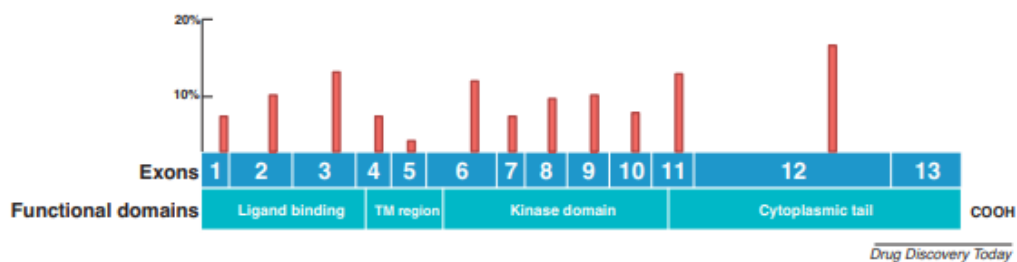


Figure 6 : Répartition des mutations du gène *BMPR2* identifiées chez les patients atteints d'HTAP (Tielemans et al., 2019).

1-2 Le récepteur *BMPRII* et ses voies de signalisation et de régulation

La protéine *BMPRII* est un récepteur membranaire ubiquitaire de la superfamille du TGF- β . Cette protéine de 1038 acides aminés possède 4 domaines fonctionnels comprenant depuis la partie N-terminale vers la partie C-terminale, un domaine de liaison au ligand, un domaine transmembranaire, un domaine kinase et un domaine cytoplasmique intracellulaire. Il existe deux isoformes, un isoforme long de 1038 acides aminés incluant tous les exons et un isoforme court amputé de l'exon 12 codant pour la queue cytoplasmique composée de 508 acides aminés (Kim et al., 2017).

Pour être fonctionnel, les récepteurs de la superfamille du TGF- β se dimérisent avec des récepteurs de la même famille : deux récepteurs de type I avec deux récepteurs de type II (Figure 7) (Tielemans et al., 2019).

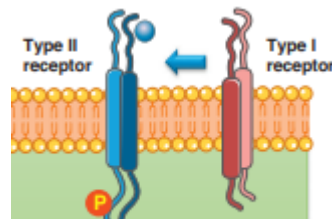


Figure 7 : Schéma de l'interaction entre les récepteurs membranaires de type I et de type II de la superfamille du TGF- β (d'après Tielemans et al., 2019).

La famille des récepteurs de type I et de type II comportent plusieurs membres : les récepteurs de type I qui sont au nombre de 7 (ALK1-7) et les récepteurs de type II qui sont au nombre de 4 : BMPRII, ACVR2a, ACVR2b et TGF β R1 (Kim et al., 2017). Une des familles de ligands de ces récepteurs sont les BMPs (Bone Morphogenic Protein). Il en existe plus de 20 membres répartis en sous-groupes par rapport à leur séquence d'acides aminés et à leur fonction. Il y a 4 groupes principaux : BMP2/4, BMP5/6/7/8a/8b, BMP9/10 et BMP12/13/14 (Kim et al., 2017). Chaque ligand à une affinité plus ou moins importante avec les différents récepteurs (Figure 8). Un ligand se lie à deux récepteurs de type I ce qui va entraîner l'hétérodimérisation avec deux récepteurs de type II. Suivant le ligand fixé, les récepteurs hétérodimérisés et le type cellulaire, différentes cascades de signalisation sont activées. Les BMPs ont un rôle dans la différenciation cellulaire lors de l'embryogenèse, l'angiogenèse, la lymphangiogenèse ainsi que le développement cardiaque. Ils ont également un rôle dans la croissance, la différenciation et l'apoptose de divers types cellulaires dont les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (Figure 9). La Figure 8 représente les différentes configurations de complexes auquel BMPRII est associé (corécepteurs et ligands) ainsi que les voies de signalisation activées.

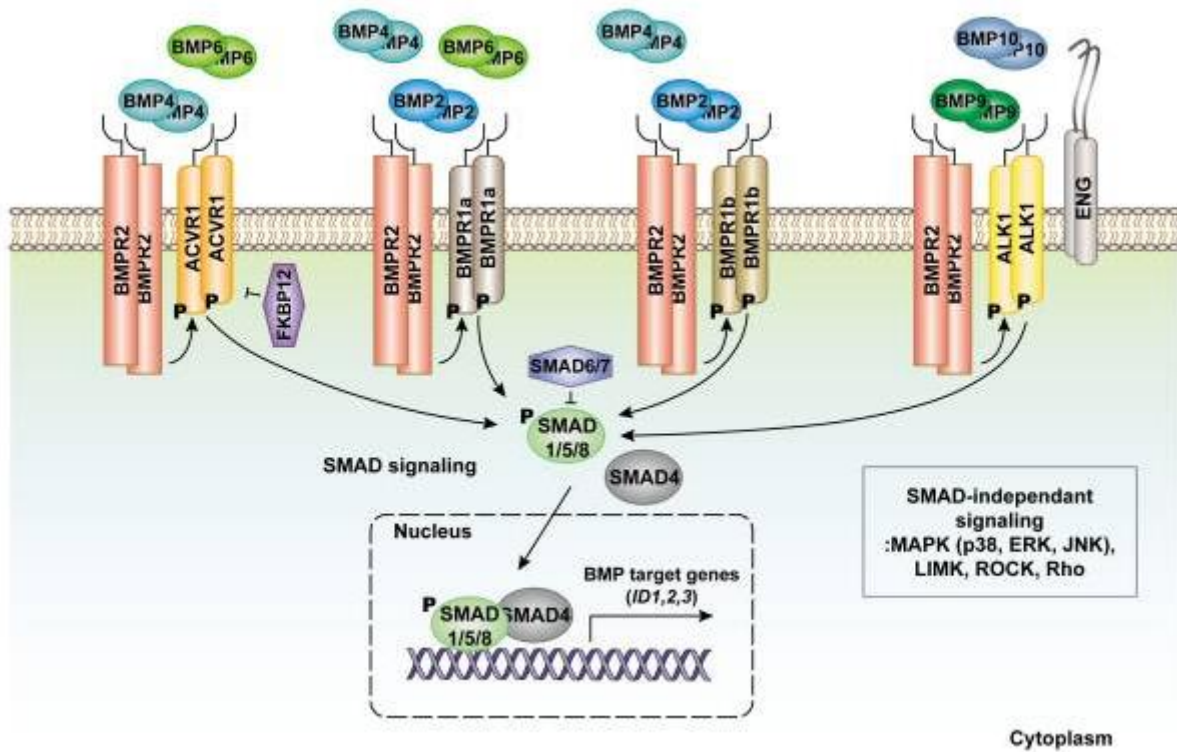


Figure 8 : Schéma des interactions entre les BMPs et les complexes hétéro-tétramériques de récepteurs de surface de type I et II ainsi que la voie canonique (SMAD dépendant) activée par ces complexes (Kim et al, 2017).

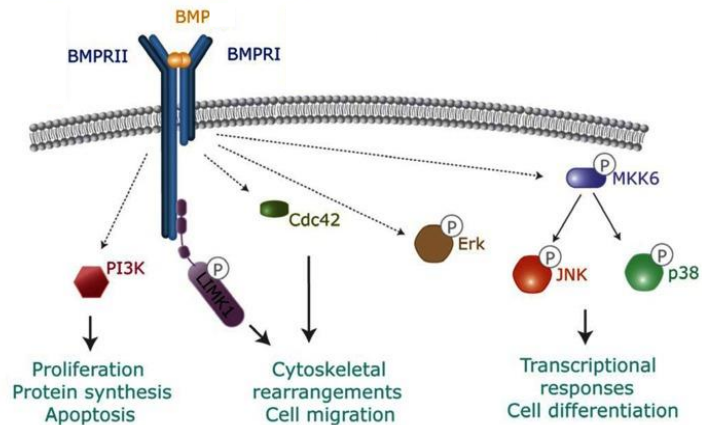


Figure 9 : Schéma et effet des voies de signalisation non canonique (SMAD indépendant) activées par le complexe BMPRI-BMPRII stimulé par les BMPs (Adapté de Gàmez et al, 2013).

1-2-1 Voie canonique dépendante des SMAD

La fixation d'un ligand sur l'homodimère de récepteur de type I va induire la dimérisation avec un homodimère de type II et former un hétérotétramère. Cette conformation va permettre l'activation du récepteur de type II qui va ensuite permettre l'activation par phosphorylation du complexe intracellulaire SMAD 1/5/9. Ce dernier va s'associer avec un co-activateur SMAD4 ce qui permet la translocation de ce nouveau complexe (SMAD 1/5/9-SMAD4) dans le noyau où il assurera une fonction de facteur de transcription (Figure 8). Ce dernier va se fixer sur des promoteurs et augmenter l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'ostéogénèse (*ID1*), la myogénèse (*MyoD*), l'hématopoïèse (*RUNX*) ainsi que le développement cardiaque (*TBX20*) en fonction du type cellulaire. SMAD 6 et SMAD 7 sont des inhibiteurs (I-SMAD) qui sont capables de perturber l'association entre les SMAD1/5/9 et SMAD4, ce qui inhibe l'expression des gènes cibles. De plus, SMAD7 favorise l'ubiquitylation et la dégradation par le protéasome des récepteurs de type I ainsi que du complexe SMAD 1/5/9 à l'aide de SMURF1 (SMAD Ubiquitin Regulatory Factor 1) et permet donc une régulation négative de la voie de signalisation.

1-2-2 Voies non canoniques indépendantes des SMAD

La voie des BMP peut également activer d'autres voies de signalisation : la voie ERK et la voie TAK. Ces voies peuvent agir en coopération avec la voie des SMADs ou induire des réponses indépendantes de l'activité transcriptionnelle des SMADs (Figure 10). Les BMPs régulent notamment la voie des MAP kinases (ERK1/2), PI3K/Akt ou encore les protéines Rho-GTPases (Ras, Raf), voies connues pour jouer un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que la contractilité de la cellule. Cet effet nécessite l'activation de la protéine adaptatrice SCH1 (Thielen et al., 2019). La voie TAK activée par les BMP comprenant les protéines p38, JNK et NFκB nécessite un autre adaptateur : TRAF6 (Thielen et al., 2019). Il a également été montré que BMPRII peut interagir directement avec des facteurs régulateurs du cytosquelette (LIMK1, JNK) et donc jouer un rôle primordial dans certaines fonctions telles que dans la dynamique vésiculaire intracellulaire ou encore dans la migration (Zeke et al., 2016) (Podkowa et al., 2010).

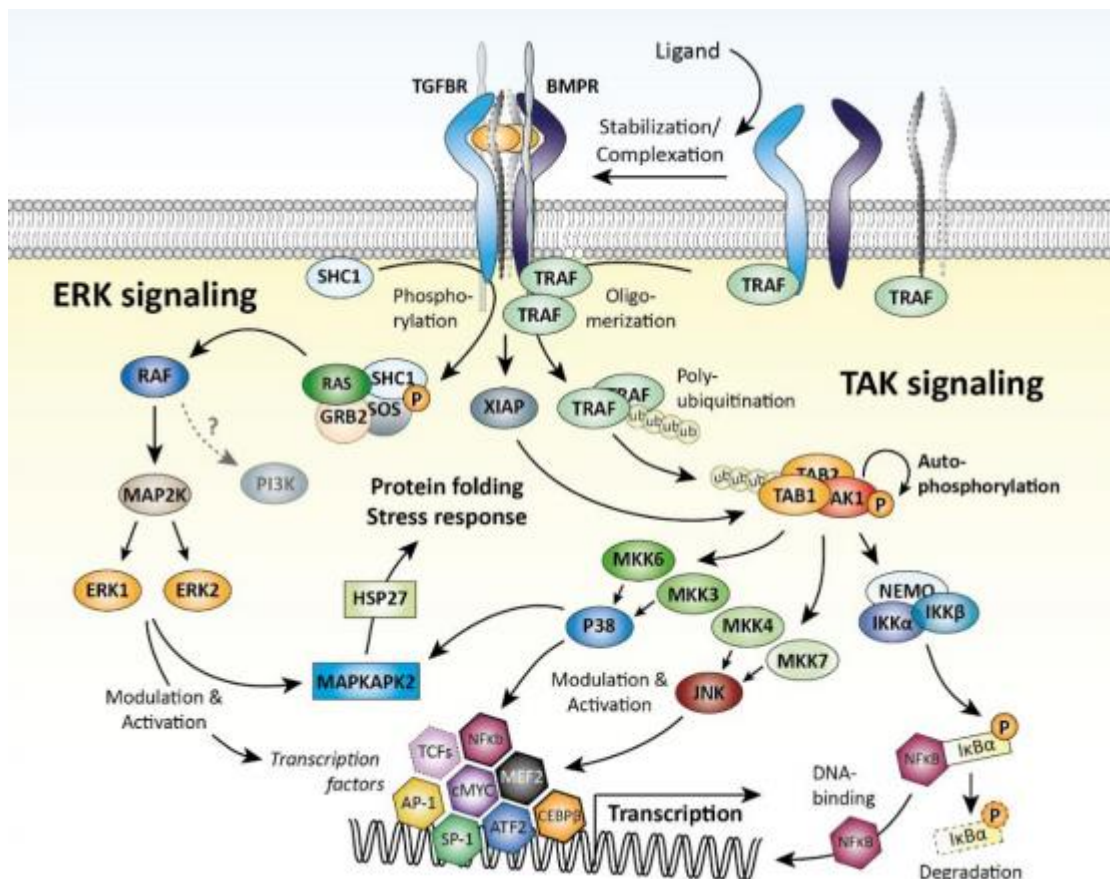


Figure 10 : Schéma des deux voies de signalisation majeures indépendantes des SMAD (d'après Thielen et al, 2019).

1-3 Relation génotype/phénotype des patients atteints d'HTAP porteurs d'une mutation du gène *BMPR2*

Les patients atteints d'HTAP et porteurs d'une mutation du gène *BMPR2* sont atteints d'une HTAP plus sévère que les autres patients sans mutation sur ce gène (Evans et al., 2016). Ils sont plus jeunes au diagnostic (35,4 vs 42 ans) et présentent des caractéristiques hémodynamiques plus sévères avec une PAPm (60,5 vs 56,4 mmHg), des résistances pulmonaires plus importantes (16,6 vs 12,9 mmHg/L/min/m²), un index cardiaque diminué (2,11 vs 2,51 L/min/m²) ainsi qu'une survie entre le diagnostic et le décès diminuée par rapport aux patients non porteurs de mutation dans le gène *BMPR2* (Evans et al., 2016; Girerd et al., 2010). Il existe également une différence de réponse aux traitements : les patients atteints d'HTAP et porteurs d'une mutation *BMPR2* répondent moins fréquemment aux vasodilatateurs que les patients HTAP sans mutation *BMPR2* (Rosenzweig et al., 2008). Plus spécifiquement, au sein des patients HTAP porteurs d'une mutation *BMPR2*, les patients qui

présentent une mutation sur la queue cytoplasmique répondent plus fréquemment aux vasodilatateurs et aux inhibiteurs calciques que les patients HTAP non porteurs de mutation *BMPR2* ou les patients présentant un autre type de mutation sur ce gène (Girerd et al., 2015). Les différents types de mutations du gène *BMPR2* induisent une altération hétérogène de la voie de signalisation SMAD 1/5/9. Des ARNm du gène *BMPR2* porteurs d'une mutation non-sens, codant pour une protéine BMPRII tronquée seront reconnus et détruits par un système de surveillance cellulaire appelé Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD). Ce système NMD évite la traduction d'une protéine tronquée, non fonctionnelle, qui serait inutile à la cellule et pouvant être même néfaste en étant un dominant négatif du récepteur. Ce mécanisme présent chez les patients HTAP présentant des mutations non-sens sur le gène *BMPR2* mène à une haploinsuffisance. Les ARNm porteurs d'une mutation faux-sens et certaines mutations non-sens échappant au système NMD induisent l'expression d'une protéine BMPRII anormale avec un changement de conformation protéique. La protéine BMPRII mal conformée peut ne pas atteindre la membrane plasmique ce qui induit également une haploinsuffisance. A l'inverse, si la protéine atteint la membrane plasmique elle sera responsable d'un effet de dominant négatif sur le récepteur non muté (Austin et al., 2009a; Rudarakanchana et al., 2002). Ainsi, une mutation menant à l'haploinsuffisance induira une diminution de 50% de l'expression de la protéine BMPRII alors qu'un effet de dominant négatif inhibera environ 75% de l'activation de la voie en aval de BMPRII. Austin et al, ont démontré que l'effet de l'haploinsuffisance ou de dominant négatif ont un impact différent sur la sévérité de la maladie. En effet, les patients porteurs d'une mutation du gène *BMPR2* qui échappent au système NMD ont une HTAP plus sévère que les patients porteurs d'une mutation reconnue par ce système (Austin et al., 2009a). Cette sévérité est définie par un âge plus jeune au diagnostic, un âge plus jeune au décès du patient et une survie réduite entre le diagnostic et le décès du patient. Il existe une différence de sévérité sur la cohorte française entre les patients HTAP porteurs de mutation *BMPR2* et les patients HTAP non porteurs de mutation *BMPR2* (caractérisée par un âge plus jeune au diagnostic et des valeurs hémodynamiques plus sévères). En revanche, aucune influence du type de mutation au niveau du gène *BMPR2* n'a été liée à la sévérité de l'HTAP (Girerd et al., 2010). Cependant, au sein même des patients HTAP porteurs d'une mutation *BMPR2* il existe également des différences de sévérité en fonction de la localisation de la mutation. En effet, les patients HTAP porteurs d'une mutation

BMPR2 au niveau de la queue cytoplasmique de la protéine, sont plus âgées au diagnostic et présentent des résistances vasculaires pulmonaires plus basses comparées à des patients porteurs d'une mutation située dans d'autres régions de la protéine *BMPRII* (Girerd et al., 2015). Cette différence de sévérité pourrait être expliquée par le fait que les mutations dans la queue cytoplasmique n'affecte pas le domaine kinase de *BMPRII*, et donc n'affecte pas la voie canonique des SMADs (Rudarakanchana et al., 2002).

Enfin, la localisation des mutations sur le gène *BMPR2* influence l'activité de la protéine. Des mutations au niveau du domaine de liaison au ligand ou une substitution d'une cystéine au niveau du domaine d'activité kinase induisent une perte de phosphorylation de SMAD5 dûe en partie à une altération de la localisation du récepteur qui est retenu dans le compartiment intracellulaire (Nishihara et al., 2002). Une mutation ne touchant pas une cystéine du domaine kinase ou affectant la queue cytoplasmique induit une protéine *BMPRII* qui est normalement adressée à la membrane plasmique mais qui possède une capacité limitée à phosphoryler SMAD5 (Nishihara et al., 2002).

De manière intéressante, les patients atteints d'HTAP idiopathique non porteurs d'une mutation sur le gène *BMPR2* présentent tout de même une diminution de l'expression de la protéine *BMPRII* (Atkinson et al., 2002).

2- Les autres gènes associés à la voie du TGF- β

Le gène *BMPR2* appartient à la superfamille du TGF- β . Or de nombreux gènes de cette famille ont été identifiés comme étant mutés chez certains patients atteints d'HTAP. Ces gènes sont *ACVLR1* et *ENG* qui sont des co-récepteurs de *BMPRII*. Les gènes *SMAD1* et *SMAD9*, des effecteurs de la voie du BMP sont également mutés chez certains patients, tout comme un ligand de la voie BMP (*GDF2*) ainsi que le gène *CAV1* (Girerd et al., 2016).

2-1 Les mutations des gènes *AVCLR1* et *ENG*

Le gène *ACVLR1* code pour un récepteur de type I de la famille des récepteurs du TGF- β principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales. Le gène *ENG* code pour une protéine impliquée dans la stabilisation du complexe ligand récepteur de la famille des récepteurs du TGF- β . Les mutations dans ces gènes ont été identifiées comme responsables de la maladie de Rendu-Osler-Weber ou Télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT) dans 96% des cas (McDonald et al., 2015). Cette maladie est une dysplasie vasculaire due à une

dérégulation de l'angiogenèse induisant des malformations artério-veineuses majoritairement pulmonaires, hépatiques et cérébrales associant des épistaxis et des télangiectasies cutanéomuqueuses. La maladie de Rendu-Osler est une maladie rare (1 cas/8000 habitants) et les mutations se transmettent sur le mode autosomique dominant avec une pénétrance complète à l'âge de 60 ans. Cependant, une faible proportion des porteurs de mutations *AVCLR1* présentent des symptômes cliniques et histo-pathologiques identiques aux patients atteints d'HTAP idiopathique ou héritable (Trembath et al., 2001). Certaines études semblent indiquer l'implication du facteur ID3 de la voie des BMP comme étant commun à l'HTAP et à la maladie de Rendu-Osler-Weber (Revuz et al., 2017) (Avecilla, 2019).

2-2 Les mutations des gènes *SMAD1* et *SMAD9*

Le gène *SMAD9* code pour la protéine SMAD9 (aussi appelé SMAD8) impliquée dans une des voies de signalisation de la superfamille du TGF- β , la voie SMAD 1/5/9. Les mutations du gène *SMAD9* retrouvées chez les patients HTAP sont des mutations non-sens induisant une diminution de l'activité transcriptionnelle du complexe SMAD 1/5/9, ce qui entraîne une diminution de l'expression d'*ID1* et des autres gènes cibles de cette voie (Shintani et al., 2009), tout comme les mutations du gène *SMAD1* (Nasim et al., 2011). Des souris mutées pour *SMAD9* présentent un remodelage vasculaire caractérisé par un épaississement de la média des artérioles pulmonaires (Huang et al., 2009). Les mutations du gène *SMAD1*, l'empêchent d'effectuer son action anti-proliférative et contribue à une division anormale des cellules musculaires lisses (Yang et al., 2005).

2-3 Les mutations du gène *CAV1*

Le gène *CAV1* code pour la protéine membranaire cavéoline-1 située au niveau des cavéoles (micro-domaines membranaires riches en cholestérol). La cavéoline-1 a un rôle dans la formation et le trafic des cavéoles, l'intégrité cellulaire par la régulation des jonctions intercellulaires mais est également connue pour jouer un rôle dans la signalisation de la voie du TGF- β (Razani et al., 2001a) ainsi que la voie du monoxyde d'azote (NO) (Ju et al., 1997). Son expression est ubiquitaire mais la cavéoline est fortement exprimée au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Des mutations homozygotes et hétérozygotes ont d'abord été identifiées chez des patients atteints de lipodystrophie (anomalie du développement du tissu graisseux) (Han et al., 2016). Des cas d'HTAP ont été retrouvés chez certains de ces patients atteints de lipodystrophie et des mutations de *CAV1*

ont été retrouvées chez des patients diagnostiqués HTAP de forme idiopathique et héritable (Austin et al., 2012). En effet, la perte de l'expression de la cavéoline-1 était suffisante pour induire une hyper-activation de la voie du TGF- β favorisant une hyper-prolifération fibroblastique ainsi que des anomalies vasculaires (Razani et al., 2001b).

2-4 Les mutations du gène *GDF2*

Le gène *GDF2* code pour un ligand extracellulaire de la voie du BMP (BMP-9) décrit comme important dans l'homéostasie de l'endothélium vasculaire. En effet, le BMP-9 est un ligand qui se lie sur le complexe formé par les récepteurs BMPRII et ALK1 (David et al., 2007). Ce gène a été identifié avec une mutation non-sens chez un enfant atteint d'HTAP (Wang et al., 2016) mais également des mutations faux-sens chez l'adulte (Gräf et al., 2018). Ces patients présentent une diminution de la production cellulaire de BMP-9 (Hodgson et al., 2020), et selon Long et son équipe, l'apport exogène de BMP-9 pour compenser cette perte est bénéfique chez ces patients et pourrait donc être une voie thérapeutique prometteuse (Long et al., 2015). La découverte de mutations dans ce gène renforce l'importance de la voie BMPRII dans la physiopathologie de l'HTAP.

3- Les mutations du gène *TBX4*

Les mutations du gène *TBX4* ont été récemment identifiées dans des cas d'HTAP de l'enfant. Les mutations hétérozygotes induisant une inactivation de *TBX4* sont responsables d'une dysplasie osseuse très rare touchant les os des membres inférieurs appelé syndrome coxo-podo-patellaire (Kerstjens-Frederikse et al., 2013). Les enfants porteurs d'une mutation du gène *TBX4* développeront une HTAP sévère (Kerstjens-Frederikse et al., 2013). De plus, 3 cas de mutation chez l'adulte ont été identifiés dans la cohorte française (Levy et al., 2016). Cependant, le rôle de *TBX4* dans les vaisseaux n'est pas encore connu. Il semblerait que *TBX4* pourrait intervenir dans le développement de pathologies cardiovasculaires via sa connexion avec la voie BMP/SMAD (Kerstjens-Frederikse et al., 2013). Plus récemment, une étude de Thoré et al, a étudié les caractéristiques des patients HTAP porteurs d'une mutation *TBX4*. Cette étude met en évidence que ces patients présentent des HTAP sévères (âge médian au diagnostic à 29 ans, résistances vasculaires pulmonaires médian à 13,6 unités de Wood), majoritairement des femmes (3:1) (Thoré et al., 2020). Par ailleurs, en analyse histologique ces patients présentent un remodelage vasculaire pulmonaire majeur similaire à ceux

observés chez les patients atteints d'HTAP idiopathique mais également des anomalies de développement pulmonaires notamment bronchique (Thoré et al., 2020). L'hypothèse de Thoré et al, est que les anomalies radiologiques et histologiques de ces patients soient reliées au rôle développemental de *TBX4* dans le poumon. En effet, *TBX4* régule l'expression de gènes impliqués dans le développement bronchique via les gènes *FGF10* et *Nkx2.1* (Thoré et al., 2020). L'effet de *TBX4* sur les anomalies vasculaires proviendrait d'une altération de la fonction des fibroblastes pulmonaires. En effet, une étude a démontré que *TBX4* est très exprimé dans les fibroblastes et qu'il est requis pour la prolifération et la contraction cellulaire (Xie et al., 2016). Par ailleurs, au sein de ces fibroblastes il a été montré que la perte de *TBX4* régule des gènes connus dans le développement de l'HTAP tels que *KCNK6*, *CYP1B1*, *HMOX1* et *ESM1* (Yan L et al ., 2019).

4- Les mutations des canaux ioniques (*KCNK3*, *ABCC8* et *KCNA5*)

Aujourd'hui 13 mutations mono-alléliques différentes ont été identifiées sur le canal *KCNK3* chez des patients HTAP ainsi qu'une mutation bi-allélique chez un nouveau-né (Ma et al., 2013). *KCNK3* est un canal potassique impliqué dans le maintien du potentiel de repos membranaire des cellules. La perte de fonction de ce dernier, lié aux mutations inactivantes, induirait une dépolarisation membranaire de repos et qui ainsi permettrait l'activation des canaux calciques dépendants du voltage. L'entrée de calcium par ces derniers favoriserait une contraction des cellules et diminuerait la capacité de relaxation des vaisseaux. Ces deux phénomènes combinés conduisent à terme à la réduction de la lumière vasculaire et donc à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires.

Un autre canal potassique, Kir6.2 (codé par le gène *KCNJ11*), est régulé par la protéine SUR1 codée par le gène *ABCC8*. Ce dernier présente des mutations chez certains patients atteints d'HTAP (Bohnen et al., 2018). Comme *KCNK3*, ce complexe Kir6.2-SUR1 est impliqué dans le maintien du potentiel de repos membranaire et pourrait être impliqué dans la vasoconstriction exacerbée rencontrée dans l'HTAP (Le Ribeuz et al., 2020).

De la même manière, le gène *KCNA5*, codant pour la protéine Kv1.5, impliqué également dans le maintien du potentiel de repos des cellules, a été retrouvé muté chez certains patients HTAP (Pousada et al., 2014).

5- Autres gènes impliqués dans l'homéostasie vasculaire (*NOTCH3*, *KDR*)

(Ma and Chung, 2017) ont démontré la présence de deux mutations faux-sens dans le gène *NOTCH3* chez deux patients HTAP. *NOTCH3* est le ligand du récepteur *JAGGED1* et ce dernier est décrit comme étant un acteur important dans l'homéostasie vasculaire ainsi que dans la communication entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (Rostama et al., 2014).

De plus, (Eyries et al., 2020) ont récemment identifié des mutations perte-de-fonction dans le gène *KDR* chez des patients HTAP. Le gène *KDR* code pour le récepteur au VEGF-A : Le *VEGFR2*. L'activation de ce récepteur sur les cellules endothéliales vasculaires est responsable de l'induction du processus d'angiogenèse en induisant une cascade de signalisation cellulaire qui favorise notamment la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Ferrara, 2004; Liao et al., 2010). Ce récepteur est fortement exprimé au niveau des poumons et son inhibition par le *SU5416* (Sugen) induit une immaturité vasculaire qui amène au développement d'une hypertension pulmonaire en combinaison de l'hypoxie chez le rat (Taraseviciene-Stewart et al., 2001). Ces données expérimentales suggèrent que des mécanismes physiopathologiques similaires sont à l'œuvre chez les patients mutés pour ce gène.

CHAPITRE 4 : Physiopathologie de l'HTAP

L'une des causes principales de l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires dans l'HTAP est la modification structurale des différents feuilletts cellulaires des petites artères pulmonaires (diamètre $\leq 500 \mu\text{m}$). En effet, un ensemble de dysfonctions moléculaires et cellulaires vont induire un remodelage allant jusqu'à l'obstruction progressive du lit vasculaire pulmonaire distal.

L'endothélium est formé par une monocouche de CEs faisant l'interface entre la lumière vasculaire et la paroi du vaisseau. En plus de sa fonction de barrière semi-perméable, l'endothélium est un acteur majeur de l'homéostasie vasculaire. Des stimuli physiques (contraintes de cisaillement dû au flux sanguin) ou moléculaires (neurotransmetteurs, hormones circulantes, produits plaquettaires ou de la coagulation sanguine) provenant du sang vont activer la sécrétion de facteurs par les CEs permettant de moduler le tonus vasculaire, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire ou encore la régulation de la fibrinolyse. Les CEs sont le plus souvent dans un état quiescent caractérisé par un état vasodilatateur, anti-thrombotique, anti-inflammatoire et anti-prolifératif. Cependant, dans certains processus physiologiques comme l'angiogenèse ou en conditions pathologiques telles que l'artériosclérose, l'insuffisance cardiaque ou encore l'HTAP, les CEs peuvent transiter dans un état actif et présenter un phénotype vasoconstricteur, pro-thrombotique, pro-inflammatoire et pro-prolifératif.

Le déséquilibre vers un état actif des CEs est retrouvé dans des pathologies vasculaires telles que la maladie de Rendu Osler (Jacobson, 2000) ou dans de nombreux cancers caractérisés par une angiogenèse tumorale (Hida et al., 2018). L'angiogenèse tumorale est définie par une organisation anarchique, une forte perméabilité vasculaire ainsi qu'une prolifération accrue induite par un déséquilibre de la balance entre les facteurs pro-angiogéniques (famille du VEGF) et anti-angiogéniques (TSP-1) (Kazerounian and Lawler, 2018). L'HTAP, à l'inverse, présente un défaut d'angiogenèse (Tuder et al., 2001; Voelkel and Gomez-Arroyo, 2014), une raréfaction vasculaire (Vaillancourt et al., 2015), une hyper-prolifération des cellules musculaires lisses (Vaillancourt et al., 2015) et une vasoconstriction excessive (Oka Masahiko et al., 2007) (Pozeg Zlatko I. et al., 2003).

En condition physiologique, la CML des artères pulmonaires (CML-AP) présente un phénotype contractile grâce à sa forte concentration en filaments d'actine et de myosine qui assurent le

maintien et la modulation du tonus vasculaire (Frid et al., 1997). Le phénotype des CMLs peut être modulé d'un phénotype contractile en un phénotype dit synthétique représentatif d'une prolifération anormale. Ce phénotype est le plus souvent observé dans un contexte pathologique comme l'HTAP. Ce nouveau statut modifie leur fonction contractile vers une activité proliférative et migratoire accrue ainsi qu'une production importante de MEC (Steudel et al., 1997).

Les fibroblastes sont des cellules principalement productrices de MEC. La composition de la MEC a un rôle important dans la pathogénèse de l'HTAP (Thenappan et al., 2018). Dans le contexte pathologique, ces cellules s'activent en myofibroblastes. Ces derniers sont responsables de la modification de la composition de la MEC notamment dans le dépôt et l'activation du collagène périvasculaire qui favorise la rigidification des artères (Philp et al., 2018). Il y a également une augmentation des métalloprotéinases (MMPs) mais également une diminution des inhibiteurs endogènes des MMPs (TIMPs) (Galis and Khatri, 2002). Le déséquilibre d'expression entre les MMPs et les TIMPs va favoriser la dégradation de la MEC et la libération des facteurs de croissance piégés à l'intérieur. Ces facteurs, comme le FGF, une fois libérés favorisent la croissance des cellules vasculaires pulmonaires (Thompson and Rabinovitch, 1996). La rigidification des artères va également activer des voies de mécano-transduction (voies YAP/TAZ, TRPC, TGF- β ou NF- κ B) et favoriser la prolifération des cellules d'artères pulmonaires (CEs et CMLs) mais va également entraîner une modification de leur métabolisme en les dirigeant vers une glycolyse anaérobie (Bertero et al., 2016).

Ces fibroblastes sont des cellules très importantes dans l'homéostasie vasculaire, et certaines voies de signalisation pourraient être ciblées dans de futurs traitements de l'HTAP (voies YAP/TAZ, voie MMP/TIMP).

Les péricytes, cellules péri-vasculaires parfois appelées cellules de Rouget, sont retrouvés au niveau de la lame basale des capillaires. Ces cellules entourent les vaisseaux grâce à leurs longs prolongements cytoplasmiques. Les péricytes sont des régulateurs centraux dans des processus tels que le développement vasculaire, la stabilisation et la maturation des capillaires principalement (Armulik et al., 2005). Les péricytes régulent notamment les cellules endothéliales (croissance, prolifération, différenciation et migration cellulaire), les cellules musculaires lisses (contraction, flux capillaire) ainsi que les cellules immunitaires (Armulik et

al., 2005). Ces cellules présentent également un fort pouvoir de trans-différentiation en cellules musculaires lisses ou en fibroblastes (Armulik et al., 2005).

Il a d'ailleurs été récemment montré qu'ils s'accumulent autour des vaisseaux pulmonaires remodelés des patients HTAP. De plus, ces péricytes présentent un phénotype et une fonction altérés chez les patients atteints d'HTAPi. En effet, chez ces patients, les péricytes ont des capacités migratoires et prolifératives augmentées de par la plus grande expression de CXCR7 et du TGF β -RII respectivement (Bordenave Jennifer et al., 2020). De plus, la couverture péricytaire sur les vaisseaux est augmentée par l'augmentation d'expression de deux principaux facteurs produits par l'endothélium (FGF-2 et IL-6) (Ricard Nicolas et al., 2014). Par ailleurs, le FGF-2 et l'IL-6 sont décrits comme responsables de la différenciation des péricytes en cellules proches des cellules musculaires lisses (Ricard Nicolas et al., 2014). Une autre étude par Chang et al, confirme l'implication du FGF-2 et des péricytes dans le remodelage vasculaire. En effet, ils montrent que des souris déficientes en perlecan héparane sulfate (PHS), un protéoglycane présent dans le MEC qui lie le FGF-2, présentent une réduction de la couverture péricytaire ainsi qu'une plus faible muscularisation des artères pulmonaires et atténue l'HTAP induite par l'hypoxie (Chang et al., 2015). De la même manière, dans le modèle d'HTP induit chez la souris par l'hypoxie chronique, ces péricytes sont impliqués dans le remodelage vasculaire (muscularisation) des petites artères pulmonaires (Bordenave Jennifer et al., 2020). Ces péricytes sont de nouveaux acteurs dans la physiopathologie de l'HTAP et présentent des caractéristiques intéressantes qui pourraient être ciblées dans un cadre thérapeutique pour l'HTAP.

1- Histologie de l'HTAP

1-1 Les lésions intimes

Les lésions intimes correspondent à une accumulation de cellules mésenchymateuses entre l'endothélium et l'élastique interne artérielle (Figure 11). La fibrose intinale est principalement constituée de fibres de collagène et d'élastine produites par des cellules de type myofibroblastique. Ce type de lésion est retrouvé communément dans l'HTAP.

La fibrose intinale pourrait être due à une migration des cellules exprimant l' α -SMA et dépourvues de marqueurs endothéliaux dans la surface interne des vaisseaux, cependant l'origine de ces cellules n'est pas bien connue. (Yi et al., 2000) proposent une origine myofibroblastique adventitielle alors que (Tuder et al., 1994) proposent une origine endothéliale et (Nishimura et al., 2002) indiquent une transition endothélio-mésenchymateuse. Ces lésions peuvent être excentriques ou concentriques, bien organisées de fibres élastiques et de collagène (Figure 11).

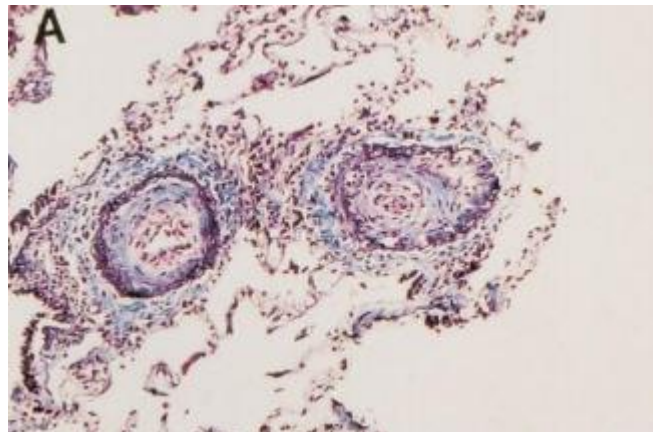


Figure 11: Coloration Trichrome de lésions intimes retrouvées chez des patients HTAP (d'après Nishimura et al., 2002).

1-2 Les lésions plexiformes

Les lésions plexiformes sont des lésions plus complexes situées en aval d'une bifurcation d'une artère pulmonaire. Ces lésions sont formées d'amas de CEs (marquage CD31+, CD34+ et CD41+), de CMLs (α -SMA, Desmine), et de myofibroblastes formant des nids de petits vaisseaux bien organisés (Nishimura et al., 2002) en plus d'un infiltrat des cellules inflammatoires de Lymphocytes T (Tuder et al., 1994) (Figure 12). Il est également retrouvé un microenvironnement spécifique contenant une forte concentration de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF- α et ses récepteurs associés (VEGFR1 et VEGFR2), HIF-1 α et de l'angiotensine 1 (Jonigk et al., 2011). Ce type de lésion est retrouvé dans des HTAP sévères principalement dans les HTAPi et dans quelques cas d'HTAP induite par prise d'anorexigène (Nishimura et al., 2002).

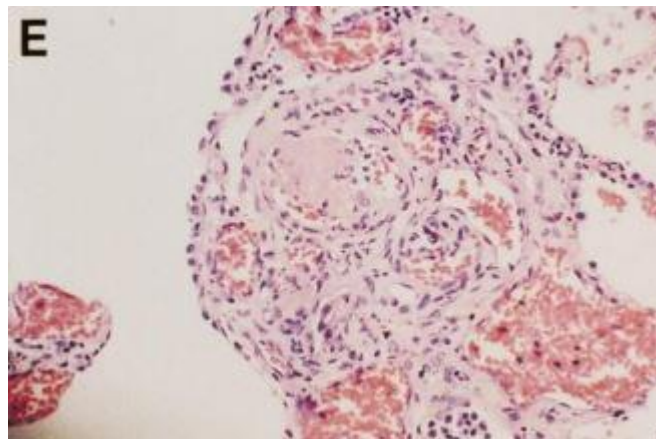


Figure 12: Coloration Hématoxyline-Eosine de lésions plexiformes retrouvées chez des patients HTAP (d'après Nishimura et al., 2002).

1-3. L'hypertrophie de la média

Une dysfonction des CMLs pulmonaires peut induire un épaissement de la média des artères pulmonaires du à une prolifération aberrante et une résistance à l'apoptose de ces cellules (Archer Stephen L. et al., 2010). Par ailleurs, les CMLs surexpriment la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), une enzyme également dérégulée dans les cancers. Cette enzyme est responsable d'un changement métabolique en faveur d'une glycolyse anaérobie et supporte les processus pro-prolifératifs (Lyle et al., 2017). De plus, les artérioles normalement non muscularisées subissent une modification structurale impliquant

l'apparition de une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses (néo-muscularisation) initialement par migration puis par prolifération de ces dernières (McLaughlin et al., 2015). Ce remodelage entraîne une obstruction des vaisseaux ainsi qu'une rigidification vasculaire (Wilkins et al., 2018) (Figure 13).

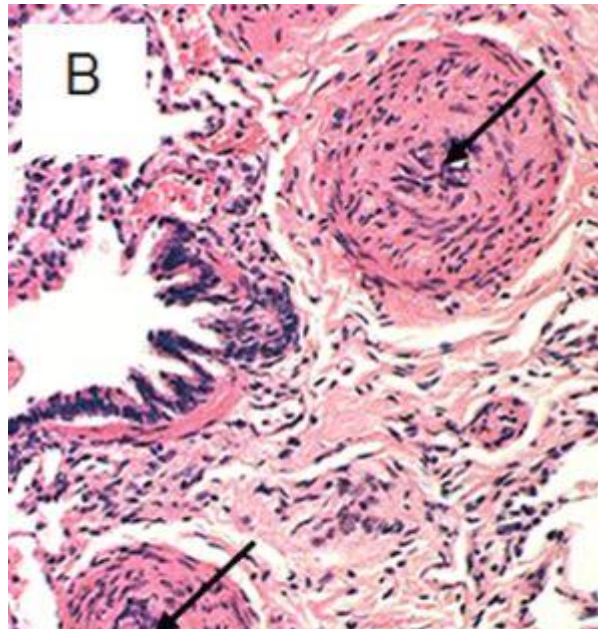


Figure 13: Coloration Hématoxyline-Eosine d'hypertrophie médiale chez des patients HTAP (d'après Wilkins et al., 2018).

2- Altération de la prolifération et de la survie cellulaire

L'acquisition d'un phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des CEs et CMLs d'artères pulmonaires est une phase clé dans le remodelage vasculaire pulmonaire impliqué dans le développement de l'HTAP (Sakao et al., 2010). La prolifération cellulaire est enclenchée par la réception d'un signal de prolifération sur une cellule quiescente induisant son entrée dans le cycle cellulaire. Les facteurs de croissances, les agents vasoactifs (endothéline, prostaglandines ou peptides natriurétiques) ou encore une altération des canaux K^+ (KCNK3, Kir6.2 ou Kv1.5) sont des signaux pro-prolifératifs et anti-apoptotiques fortement impliqués dans l'HTAP (Thompson and Lawrie, 2017). Des anomalies de voies de signalisation telles que la reprogrammation métabolique, les mi-ARN ou encore la réponse aux dommages à l'ADN ont été mis en évidence comme responsable du changement de phénotype des CEs et CMLs d'AP dans l'HTAP (Thompson and Lawrie, 2017).

2-1 Les facteurs de croissances

Les facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le NGF (Nerve Growth Factor) ou encore le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sont de puissants agents mitogènes anti-apoptotiques ainsi que chimio-attractants pour les CMLs et les CEs d'AP (Sakao et al., 2010; Tajsic and Morrell, 2011).

Les facteurs de croissance se lient spécifiquement à des récepteurs à activité tyrosine kinase (Figure 14) et vont activer des voies de signalisation spécifiques telles que la voie JAK-STAT, PI3K-AKT, la phospholipase C (PLC) ou encore la voie des MAPKinases (Katzel et al., 2009).

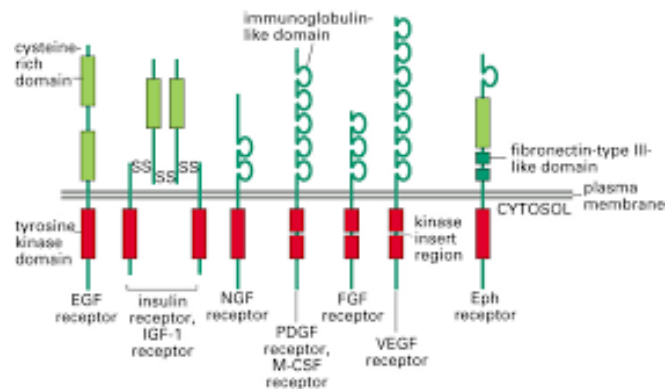


Figure 14 : Schéma de structure des différents récepteurs à activité tyrosine kinase des facteurs de croissance suivants : EGF, IGF, NGF, PDGF, FGF, VEGF et Eph (D'après Katznel et al, 2009).

2-1-1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

L'expression de certains facteurs de croissance (VEGF) et/ou de leurs récepteurs (VEGFR-2) est augmentée dans les CEs présentes dans les lésions plexiformes de patients atteints de forme sévère d'HTAP (Hirose et al., 2000). Bien que certains résultats sur l'expression des différents isoformes du VEGF diffèrent entre l'Homme (Tableau 4) et les modèles animaux (Tableau 5), la majorité de ces études confirment une augmentation globale de leurs expressions. Cependant, le développement d'une HTAP sévère chez l'animal, après injection d'un inhibiteur du VEGFR2 (Sugen) associé à une hypoxie chronique est paradoxal avec les taux d'expressions des différents isoformes du VEGF et de leurs récepteurs associés car ils sont opposés à ce qui est retrouvé chez l'Homme.

Condition	Source	Observation
Hypertension Artérielle Pulmonaire	Tissu Pulmonaire	Augmentation du VEGF
Hypertension persistante du nouveau-né	Aspiration Trachéale	Augmentation du VEGF
Hypertension pulmonaire et dysplasie bronchopulmonaire	Tissu Pulmonaire	Augmentation du VEGF

Tableau 4 : Expression du VEGF dans différentes formes d'hypertension artérielle pulmonaire humaine (D'après Voelkel et Gomez-Arroyo, 2014).

Condition Expérimentale	Animal	Observation	Référence
Hypoxie Chronique	Rat	Diminution de l'ARNm du VEGF dans le VG	(Tuder et al., 1995)
Hypoxie Chronique	Rat	Diminution de l'expression du VEGF pulmonaire	(Yamamoto et al., 2008)
Hypoxie Chronique	Rat	Diminution de l'expression du VEGFB pulmonaire	(Sands et al., 2011)

Tableau 5 : Expression du VEGF et de ses récepteurs dans différents modèles animaux d'hypertension pulmonaire (d'après Voelkel et Gomez-Arroyo, 2014).

Une hypothèse de (Voelkel and Gomez-Arroyo, 2014) indiquerait que l'inhibition chronique du VEGFR2 par le Sugén induirait une sélection des cellules endothéliales par apoptose. Les cellules résistantes à l'apoptose présenteraient par la suite un phénotype pro-prolifératif dans le modèle animal Sugén/Hypoxie (SuHx) et seraient responsables de l'occlusion des vaisseaux pulmonaires (Sakao et al., 2005) (Figure 15).

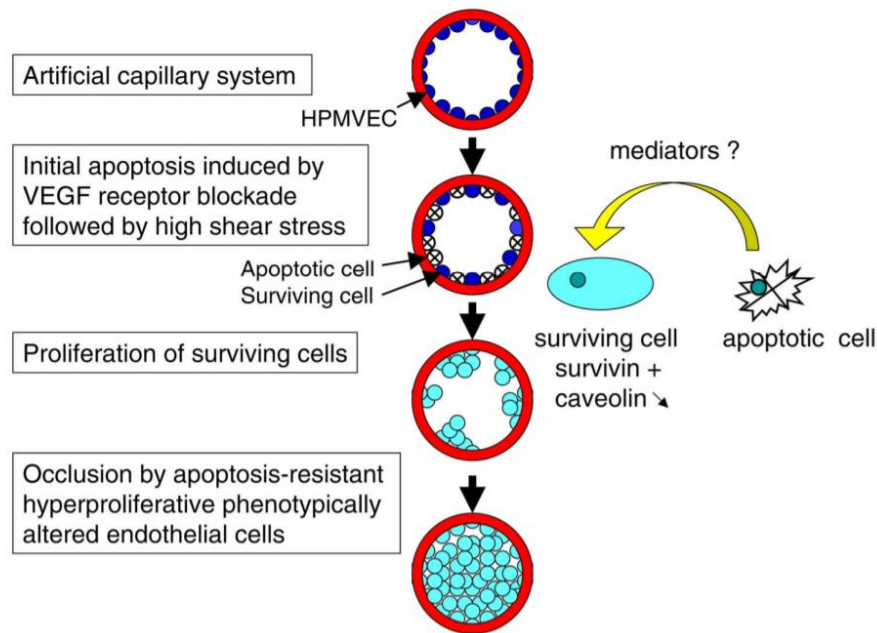


Figure 15: Schéma de l'hypothèse de sélection par l'apoptose dans le modèle SuHx (d'après Sakao, 2005).

2-1-2 Ténascine-C

La ténascine-C est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire produite par les cellules musculaires lisses et impliquée dans leur prolifération et leur migration en favorisant la réponse aux facteurs de croissance tel que l'EGF ou le bFGF (Morrell et al., 2009) (Jones and Rabinovitch, 1996). En effet, il a été montré une co-localisation entre l'EGF et la ténascine-C. De plus, la ténascine-C serait responsable du regroupement et de l'activation de ces récepteurs dans les lésions vasculaires pulmonaires des patients d'HTAP (Jones et al., 1997). Une étude de (Cowan et al., 1999) a montré que la perte de la ténascine C induisait une apoptose des CML et permettait ainsi une régression des lésions vasculaires dans le modèle d'HTP induit chez le rat par l'exposition à la monocrotaline.

2-1-3 Fibroblast Growth Factor (FGF)

Le FGF est une famille de facteurs de croissance composée de 23 membres (FGF-1 à FGF-23) sécrétés par les fibroblastes et qui favorisent la division et la migration cellulaire. Ces protéines sécrétées vont assurer leur effet mitogénique via un récepteur à activité tyrosine kinase : le FGF-R.

La mesure du taux sérique et pulmonaire de FGF-2 a montré un niveau d'expression élevé de ce facteur de croissance dans les différents modèles animaux d'HTP mais également chez les patients atteints d'HTAP (Benisty et al., 2004).

2-1-4 Platelet Derived Growth Factor (PDGF)

Le PDGF est un facteur de croissance majoritairement sécrété par les plaquettes sanguines composé de deux chaînes qui se dimérisent. Il existe 4 isoformes de PDGF, le PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D (Folestad et al., 2018). Le PDGF est essentiellement composé d'homodimères à l'exception d'une conformation comprenant une chaîne A et B (PDGF-AB) (Folestad et al., 2018). Ces ligands peuvent se fixer sur deux types de récepteurs (PDGFR- α et PDGFR- β) et induire leur phosphorylation qui active en fin de cascade un programme transcriptionnel favorisant la prolifération et la croissance cellulaire (Westermarck et al., 1989). L'expression transcriptionnelle du PDGF-AA et PDGF-BB ainsi que leurs récepteurs (PDGFR- α et PDGFR- β) est augmentée dans les lésions vasculaires de patients atteints d'HTAPi (Perros et al., 2008). Dans les artérioles pulmonaires, le PDGFB est surexprimé dans les CEs, les CMLs ainsi que dans certaines cellules inflammatoires des lésions vasculaires pulmonaires des patients atteints d'HTAPi. Par ailleurs, la sérotonine, dont l'expression est également augmentée dans l'HTAP, peut trans-activer le récepteur au PDGF via son récepteur et induire la prolifération des CML (Ren et al., 2011). En effet, lors de la fixation de la 5-HT sur son récepteur couplé à une petite protéine G α i, il y a activation de PLC dans un premier temps, puis cette dernière va activer la PKC. La PKC est ensuite responsable de l'activation de la NADPH Oxydase qui va produire des ROS (Reactive Oxygen Species). Ces ROS produites par cette cascade de signalisation ou un apport exogène d'eau oxygénée (H₂O₂) est capable d'activer à la fois la voie ERK 1/2 mais également d'activer les récepteurs membranaires PDGFR et TrkB indépendamment de la présence de leur ligand (Figure 16) (Kruk et al., 2013). Il a également été démontré que l'Imatinib, un inhibiteur des récepteurs à tyrosine kinase dont le PDGF, inhibe la prolifération et promeut l'apoptose des CMLs-AP d'HTAP (Ghofrani et al., 2005; Schermuly et al., 2005). L'imatinib a fait l'objet d'un essai clinique par Novartis sous le nom de IMPRES (Imatinib Mesylate in Pulmonary arterial hypertension, a Randomized Efficacy Study) (Hoeper et al., 2013; Shah et al., 2015a). Les patients de cette étude traités avec l'Imatinib ont présenté des améliorations des paramètres échocardiographiques et hémodynamiques (Hoeper et al., 2013; Shah et al., 2015a). A l'heure actuelle, l'utilisation de

l'imatinib pour traiter les patients atteints d'HTAPi est suspendue car ce traitement présente trop d'effets secondaires graves comme l'apparition d'hématomes sous-duraux (Hoepfer et al., 2013). Cependant, il est important de noter que d'autres inhibiteurs des récepteurs à tyrosine kinase tels que le Dasatinib présentent des effets opposés en étant responsables du développement d'HTAP chez certains patients (Shah et al., 2015b). En effet, le traitement par le Dasatinib induit une dysfonction de l'endothélium vasculaire par l'augmentation de la production de ROS et une induction d'un stress du réticulum endoplasmique (RE Stress (Guignabert et al., 2016)).

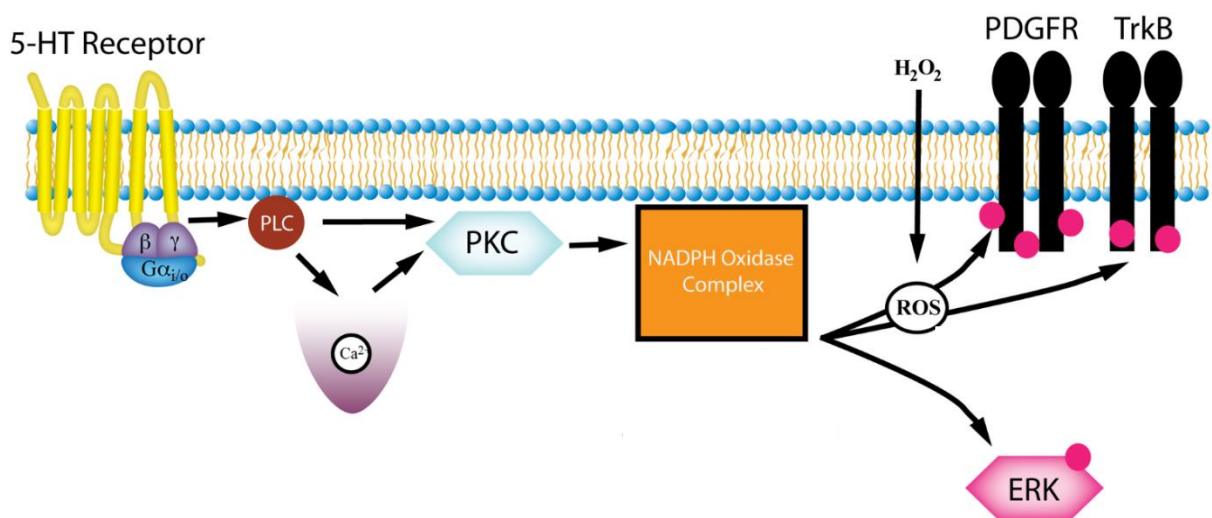


Figure 16: Schéma du mécanisme de transactivation des récepteurs PDGFR et TrkB par la sérotonine (d'après Kruk et al, 2013).

2-1-5. Transforming Growth Factor (TGF) and Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Enfin, le TGF- β et les BMPs sont également une famille de facteurs de croissance qui se fixent à leurs récepteurs spécifiques à activité sérine-thréonine kinase. La fixation du TGF- β sur son récepteur (TGF- β R) induit l'activation de la voie SMAD 2/3 alors que la fixation des BMPs sur le récepteur dimérisé BMPRI-BMPRII induit l'activation de la voie SMAD 1/5/8 et peut également activer la voie des MAP Kinases (ERK1/2, JNK, p38). En condition physiologique, on retrouve une balance dans l'activation de ces deux types de récepteurs qui permet d'obtenir un équilibre dans la croissance et le développement cellulaire. Cependant dans l'HTAP, la dysfonction de ces récepteurs à activité sérine-thréonine kinase favorise à la fois la prolifération des CMLs vasculaires pulmonaires et l'apoptose des CEs par la stimulation, en

partie, des voies de prolifération des MAP Kinases via le récepteur TGF-βR et par la perte du frein normalement exercée par la voie de signalisation dépendante de BMPRII (Tielemans et al., 2019)

2-2 La sérotonine

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine synthétisée par les cellules du raphé situé dans le système nerveux central, par les cellules entérochromaffines de la paroi intestinale ou encore par les CEs pulmonaires. Après sa production, la 5-HT est stockée dans les plaquettes sanguines pour être délivrée, métabolisée puis finalement dégradée principalement au niveau hépatique et pulmonaire (Figure 17). Il existe un transporteur de la sérotonine, 5-HTT (SERT), et 7 familles de récepteurs (5-HT1 à 5-HT7) (Adnot et al., 2013). Au niveau

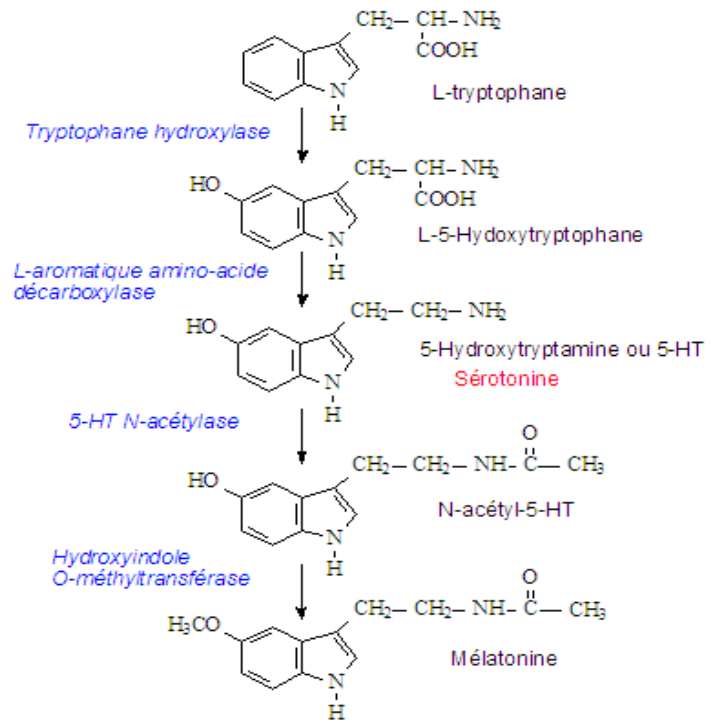


Figure 17: Schéma représentant la voie de production et de dégradation de la sérotonine chez l'Homme.

pulmonaire, en plus des plaquettes, la production endothéliale (Eddahibi and Adnot, 2006) de sérotonine joue un rôle important dans la prolifération des CMLs-AP et la vasoconstriction artérielle pulmonaire. L'action vasoconstrictrice de la sérotonine sur les CMLs s'effectue par fixation à ses récepteurs : 5HT_{1B}, 5-HT_{1D} ou 5-HT_{2A} (MacLean et al., 1996; McLean and Coupar, 1996) alors que son activité mitogénique s'effectue par l'import dans le cytoplasme grâce à la coopération entre le récepteur spécifique 5-HT_{1B}R et le transporteur 5-HTT (Morecroft et al., 2005). En effet, l'entrée de 5-HT agit sur la protéine Nox1 et serait responsable de la production de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène qui ensemble induisent une oxydation massive des protéines intracellulaires et favorise la prolifération des CML et le remodelage de la matrice extracellulaire (Figure 18) (Hood Katie Y. et al., 2017).

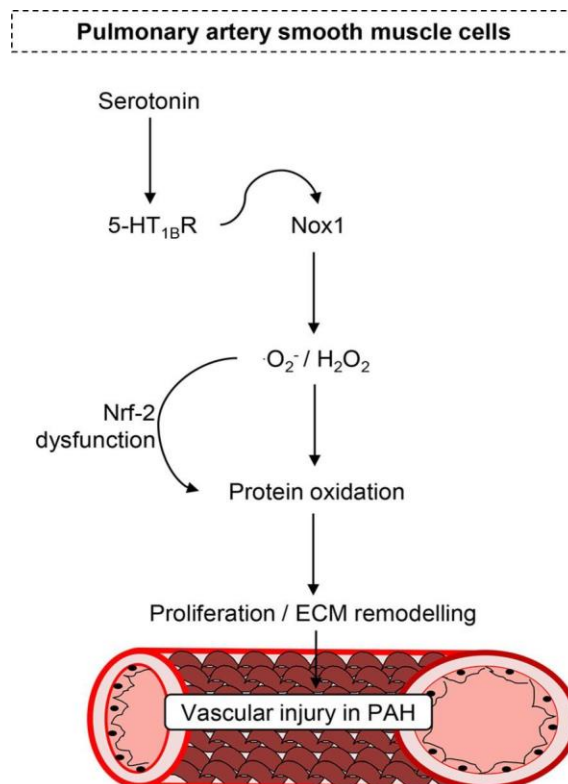


Figure 18: Schéma représentant la voie de signalisation responsable de l'effet pro-prolifératif de la sérotonine sur les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (D'après Hood Katie Y et al, 2017).

3- Altération des voies de signalisation régulées par le récepteur BMPRII

Le récepteur BMPRII est fortement exprimé au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire et de façon moindre dans les cellules musculaires lisses pulmonaires (Atkinson et al., 2002). La diminution d'expression de BMPRII est impliquée dans le remodelage vasculaire, principalement caractérisé par une hypertrophie de la média due à une prolifération accrue et à une résistance à l'apoptose des CMLs. En effet, les CMLs d'AP de patients atteints d'HTAP idiopathique ayant une diminution de l'expression de BMPRII, présentent une résistance à l'effet anti-prolifératif (Yang et al., 2005) et pro-apoptotique (Zhang et al., 2003) d'une stimulation par BMP2/4/7 comparé aux CMLs de patients atteints d'HTAP secondaires ou de CMLs issues de sujets non HTAP.

Au niveau des CE, une diminution d'expression de BMPRII induit l'effet inverse, en inhibant la prolifération, la survie ainsi que la migration cellulaire (Dyer et al., 2014; Southwood et al., 2008). Le BMP-9 aurait un effet bénéfique en activant la voie du BMP sur les cellules endothéliales et prévient l'HTP dans différents modèles animaux (MCT, SuHx, et modèle génétique de souris mutés sur *Bmpr2*). La stimulation de la voie BMP par le BMP-9 serait en mesure d'activer des voies inhibitrices de l'apoptose et garantirait ainsi une intégrité de

l'endothélium (Long et al., 2015). BMPRII module également des processus intracellulaires par l'interaction de sa queue cytoplasmique avec des protéines du cytosquelette. En effet, BMPRII peut interagir directement avec LIMK1 (Foletta et al., 2003) et permettre la phosphorylation de la cofiline. BMPRII peut également interagir et activer des protéines tels que la PI3K ou la RhoGTPase Cdc42 (Gamell et al., 2008). LIMK1 et la cofiline sont des facteurs impliqués dans la dynamique de l'actine. Une diminution de l'expression de BMPRII va induire des modifications dans les processus cellulaires tels que la motilité, la division ou encore le trafic intracellulaire.

La dysfonction du récepteur BMPRII est aussi impliquée dans la perméabilité endothéliale qui est associée à l'adhésion et la transmigration des leucocytes au travers de la barrière endothéliale. Ce recrutement leucocytaire est à la base de l'inflammation pulmonaire chronique rencontrée dans l'HTAP (Burton et al., 2011; Vengethasamy et al., 2016). La voie de signalisation dépendante des BMPs interagit également avec de nombreux autres facteurs tels que le récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR- γ), la voie WNT, NOTCH, le TGF- β , le facteur HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor) ou encore le PDGF, tous impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP (Dyer et al., 2014).

4- La transition endothélio-mésenchymateuse

La transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT) est un processus de modification de phénotype d'une cellule endothéliale vers un phénotype mésenchymateux. Ce processus physiologique est important dans le développement cardiaque, la muscularisation et la différenciation des artères pulmonaires au stade embryonnaire (Arciniegas et al., 1989, 2000, 2005; DeRuiter et al., 1997).

Ce processus, similaire à la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), bien connu dans les cancers, s'effectue en trois étapes (Figure 19) :

- La cellule endothéliale perd l'expression de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires (cellule-cellule et cellule-environnement) comme CD31, VE-Cadhérine et p-120 caténine. Cette perte de jonction va permettre aux CE de migrer dans les tissus environnants (Stenmark et al., 2016) (Arciniegas et al., 2007).
- Le phénotype de la CE transite vers un phénotype mésenchymateux en perdant progressivement ses marqueurs endothéliaux (CD34, vWF) et commence à exprimer de

nouveaux marqueurs mésenchymateux (α -SMA, Vimentine, Col-I et Col-IV). A ce stade la cellule exprime les deux phénotypes.

- La cellule endothéliale finit par perdre totalement ses marqueurs endothéliaux au profit des marqueurs mésenchymateux (Arciniegas et al., 2007; Ubil et al., 2014). Elle n'exprime plus qu'un seul phénotype. Ce phénomène est régulé par la modulation de deux principales voies de signalisation : La voie du TGF- β (Medici et al., 2011), via l'activation des facteurs de transcriptions tels que SNAIL-1, TWIST et SLUG (Cano et al., 2000; Zhou et al., 2004), et la voie SMAD (Piera-Velazquez and Jimenez, 2012).

Chez les patients atteints d'HTAP, l'endoMT a un rôle dans le développement de la maladie. En effet, il a été retrouvé une diminution de l'expression protéique des marqueurs endothéliaux et jonctionnels (p120-catenin) des CEs, ainsi qu'une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux (phosphorylation de la Vimentine, N-Cadhérine et Fibronectine) au niveau d'artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP (Figure 21). Dans ces lésions vasculaires pulmonaires, la monocouche de CE expriment de l' α -SMA et les cellules sous-endothéliales expriment des marqueurs endothéliaux tels que CD31, CD34, vWF ainsi que l' α -SMA (Hopper et al., 2016; Ranchoux et al., 2015a). L'altération de l'expression de BMPRII joue un rôle dans la présence de cette transformation dans l'HTAP. En effet les animaux génétiquement modifiés sur *Bmpr2* présentent des marqueurs de l'endoMT comme Twist, un facteur de transcription indispensable à la répression du phénotype endothélial (Ranchoux et al., 2015a). De plus, une diminution d'expression de BMPRII sur des CEs d'AP induit une augmentation d'expression de HMGA1 (High Mobility Group A1), un facteur de transcription modulant l'expression de protéines impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire.

En condition physiologique, HMGA1 n'est normalement exprimé qu'au stade embryonnaire. Cette néo-expression dans les CEs est concomitante à une réduction d'expression de CD31 ainsi qu'à une augmentation de l' α -SMA, l' α -SM22, la calponine, la phospho-vimentine ainsi que SLUG, ce qui favorise l'endoMT (Hopper et al., 2016). La présence du mécanisme d'endoMT dans l'HTAP décrit donc un modèle de développement centrifuge des lésions vasculaires à partir de la migration de fibroblastes et des progéniteurs vers la zone de remodelage (Arciniegas et al., 2007; Ranchoux et al., 2015a).

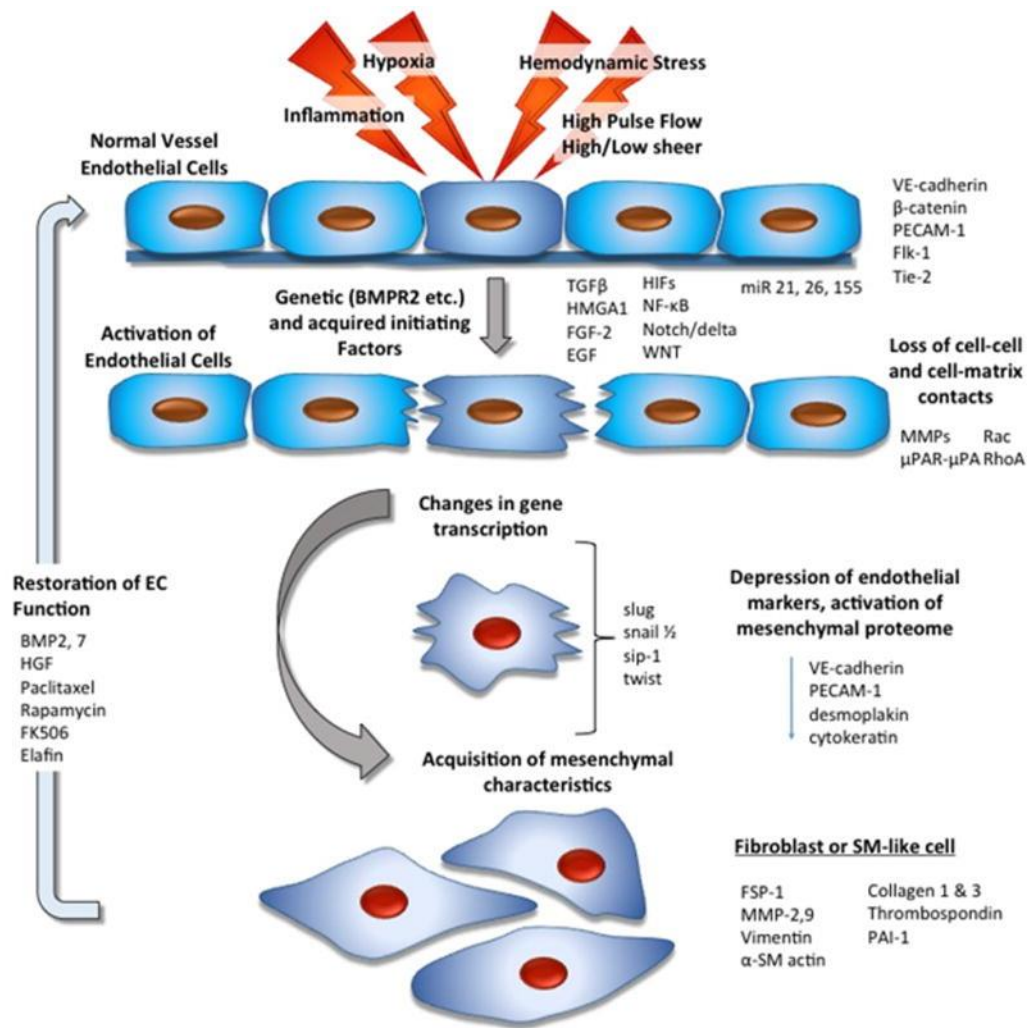


Figure 19 : Schéma représentant des mécanismes et les étapes de la transition endothélio-mésenchymateuse dans l'HTAP (D'après Stenmark et al, Circulation, 2016). EGF : Epidermal Growth Factor ; FGF : Fibroblast Growth Factor ; HIF : Hypoxia Inducible Factor ; HMG1 : High Mobility Group AT-Hook-1 ; MMP : Matrix Metalloproteinase ; NF-κB : Nuclear Factor κB ; PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule ; SM : Smooth Muscle ; TGF-β : Transforming Growth Factor-β ; VE-Cadherine : Vascular Endothelial Cadherine ; PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1 et FSP-1 : Fibroblast-Specific Protein 1.

5- Epissage alternatif de BMPRII

Le récepteur BMPRII possède 2 isoformes d'épissage alternatif. Un isoforme A qui correspond à la totalité de l'ARNm et un isoforme B amputé de l'exon 12. Cet exon 12 code pour 500 acides aminés dans la partie intracellulaire du récepteur BMPRII. Les 2 isoformes possèdent une activité kinase non modifiée. Ils peuvent donc phosphoryler les SMAD en cas d'activation par une BMP (Figure 20). Leur différence est que la voie non canonique LIMK-1 est modifiée car l'isoforme B ou la présence d'une mutation dans la queue cytoplasmique empêche l'activation de LIMK-1 qui est donc incapable de phosphoryler la cofiline et induit une désorganisation du cytosquelette de l'actine (Figure 21).

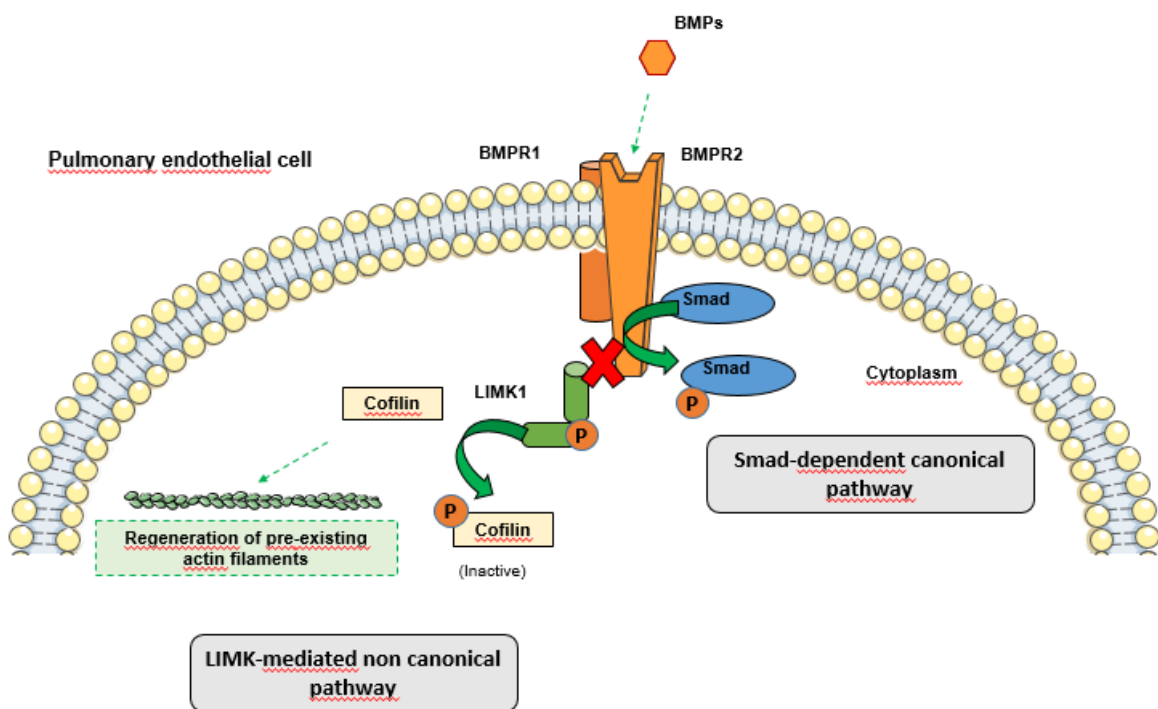


Figure 20: Schéma représentatif de la voie de signalisation de la forme courte de BMPRII (Variant B). La voie dépendante des SMAD n'est pas affectée alors que la voie dépendante de LIMK1 est modifiée dû à la perte de l'interaction entre LIMK1 et BMPRII.

Cette dynamique dans le renouvellement des fibres d'actine dans la cellule se produit de manière exacerbée. Ceci entraîne une perturbation du cytosquelette au sein de la monocouche de CE et perturbe ainsi la perméabilité vasculaire (Johnson et al., 2012).

Enfin, une étude a montré sur des lymphocytes immortalisés en culture que l'expression de l'isoforme B de BMPRII est augmentée chez les patients atteints d'HTAPh comparé à des patients contrôles. De plus, ils ont identifié le facteur d'épissage SRSF2 comme étant responsable de ce changement d'expression (Cogan et al., 2006).

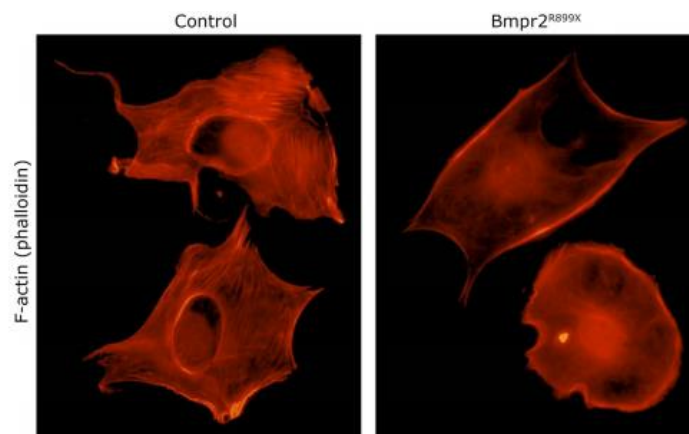


Figure 21 : Images d'immunofluorescence de la F-Actine de cellules endothéliales vasculaires de souris contrôles et mutés dans la partie codante pour la queue cytoplasmique (BMPR2-R899X) sur le gène *BMPR2* (d'après Johnson et al, 2012). Les cellules mutées possèdent une queue cytoplasmique de BMPR2 tronquée et présentent un défaut d'organisation du cytosquelette d'actine.

6- Altération du tonus vasculaire pulmonaire

Le tonus vasculaire est régulé par des facteurs vasoconstricteurs (Angiotensine II, Thromboxane A₂, Endothéline-1) et vasodilatateurs (monoxyde d'azote, prostacycline). En condition physiologique, il existe un équilibre dans la production de ces facteurs. Dans l'HTAP, la vasoconstriction est promue par une augmentation de la production des facteurs vasoconstricteurs concomitante à une diminution de l'expression des facteurs vasodilatateurs.

6-1 Facteurs vasoconstricteurs

6-1-1 Le Thromboxane A₂

Le thromboxane A₂ (TXA₂) est une cytokine qui possède un effet vasoconstricteur. Cette molécule est également impliquée dans l'agrégation plaquettaire ainsi que dans la coagulation sanguine. Le TXA₂ est transformé à partir de l'acide arachidonique, en endopéroxydes (PGG₂, PGH₂) par l'intermédiaire de l'enzyme COX (cyclo-oxygénase), puis dans un second temps par l'enzyme thromboxane synthétase (Figure 22).

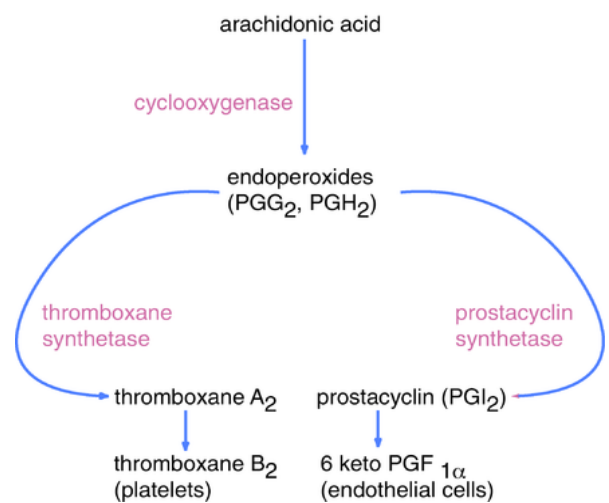


Figure 22: Voie de production de la prostacycline et du thromboxane A₂.

Le TXA₂ est produit par les plaquettes activées (thrombocytes) et va se fixer sur son récepteur exprimé par différents types cellulaires notamment les cellules musculaires lisses. Le TXA₂ induit un puissant effet vasoconstricteur. Dès 1980 (Vane and Moncada, 1980) ont émis l'hypothèse qu'il existe un équilibre entre la synthèse de thromboxane et de prostacycline. Dans les urines des patients HTAP il a été montré que le 11-dehydro-thromboxane B₂ (un produit de dégradation du TXA₂) était augmenté tandis que le 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1α} (un produit de dégradation de la prostacycline) était diminué (Christman et al., 1992). Cette étude démontre la perte d'équilibre entre les molécules vasoconstrictrices et vasodilatatrices dans l'HTAP. Plus récemment, une étude par (Langleben et al., 2002) a démontré que l'utilisation du terbogrel (inhibiteur du TXA₂ synthase et antagoniste du récepteur au TXA₂) par voie orale, a permis de réduire le taux de métabolites dans les urines de 90% mais sans effet sur le test de marche des patients traités. De plus, ce médicament a entraîné de fortes douleurs dans les membres inférieurs des patients, ce qui exclut son

utilisation à plus grande échelle pour les patients HTAP. Cependant, d'autres inhibiteurs du TXA2 pourraient être envisagés.

6-1-2 Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide sécrété par l'endothélium vasculaire qui a un effet constricteur puissant sur les CMLs. L'ET-1 est synthétisé sous forme d'un précurseur : la pré-pro-endothéline 1 (Pré-proET1). Ce peptide est ensuite clivé par une endopeptidase qui génère la pro-ET1 d'une taille de 38 acides aminés. Enfin, la pro-ET1 est activée par l'enzyme ECE-1 (enzyme de conversion de l'endothéline) pour donner l'endothéline 1. Cette molécule présente deux types de récepteurs au niveau des CMLs et des CE : ET-A et ET-B. Ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).

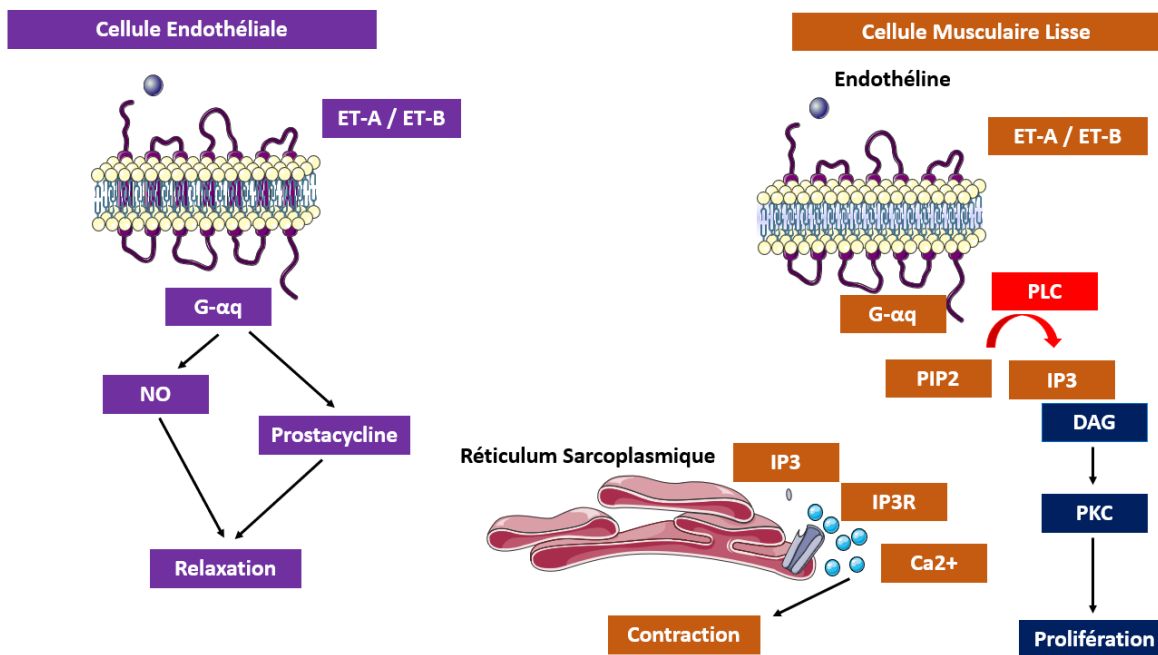


Figure 23 : Voies de signalisation de l'endothéline dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires.

Lors de la fixation de l'endothéline sur son récepteur ET-A, la sous-unité Gαq, va activer la Phospholipase C (PLC) qui va transformer le phospho-inositol diphosphate (PiP2) en phospho-inositol triphosphate (PiP3) + diacylglycérol (DAG). Le PiP3 va se fixer sur son récepteur sur le réticulum endoplasmique afin d'induire une libération de Ca²⁺ intracellulaire et ainsi initier une contraction de la CML. Le DAG va lui activer la PKC, qui va aller phosphoryler des protéines cibles et favoriser notamment des voies de prolifération cellulaire (Figure 23).

A l'inverse, sur les cellules endothéliales, le récepteur ET-B entraîne une libération de NO et de prostacycline induisant une vasodilatation des vaisseaux pulmonaires (Figure 23). Les niveaux d'endothéline sont augmentés à la fois chez les patients et dans les modèles animaux de la maladie (Chester and Yacoub, 2014).

De plus, les niveaux d'ET-1 sont corrélés avec l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires ainsi qu'avec l'intensité du remodelage vasculaire (Bressollette et al., 2001). Cette étude démontre que l'expression d'ET-1 est corrélée avec la sévérité des patients atteints d'HTAP (Bressollette et al., 2001). C'est pourquoi, des antagonistes aux récepteurs à l'endothéline ont été développés. Leur efficacité a été démontrée chez l'Homme et dans les modèles animaux de la maladie (Jasmin et al., 2001).

6-2 Facteurs vasodilatateurs

6-2-1 La voie du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un radical libre produit par les cellules endothéliales vasculaires les cellules inflammatoires et les neurones, à partir de L-Arginine (Figure 24). Les enzymes NOS (Nitric Oxide Synthase) sont responsables de la production du NO et certaines sont spécifiques à un type cellulaire particulier. L'enzyme eNOS, codé par le gène *NOS3* est spécifique aux cellules endothéliales.

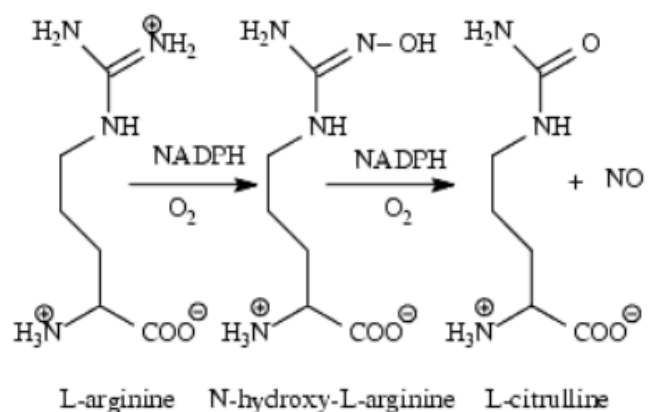


Figure 24 : Voie de production du NO.

Après sa production par les cellules endothéliales, le NO diffuse à travers les membranes vers les CMLs où il active la Guanylate Cyclase (GC) qui transforme le GTP en GMPc, un nucléotide cyclique en amont d'une cascade de signalisation qui aboutit à la relaxation des cellules musculaires lisses. De plus, le NO réprime la prolifération et la migration des CMLs en activant la Guanylate Cyclase (Sarkar et al., 1996).

Les modèles expérimentaux d'HTP sont discordants sur l'expression de la eNOS. En effet, il y a une augmentation de l'expression de l'eNOS pulmonaire chez les rats exposés à l'hypoxie

chronique (Murata et al., 2005). A l'inverse, l'expression de l'eNOS est diminuée chez les rats exposés à la monocrotaline (Pei et al., 2011). Cependant, au-delà de l'expression de la eNOS, l'activité de cette dernière est gouvernée par une phosphorylation sur la sérine 1177 (Ser1177). Il est démontré que dans les deux modèles, la eNOS présenterait un défaut d'activité avec une diminution significative de la phosphorylation Ser1177 (Murata et al., 2005; Pei et al., 2011).

Chez les patients HTAP il a été montré que le NO exhalé est diminué (Dweik, 2007). Cependant, comme chez l'animal, les études sont discordantes chez l'Homme quant à l'expression de la eNOS. (Giaid and Saleh, 1995) indiquent une diminution de eNOS alors que (Zhao et al., 2009) démontrent qu'il n'y a pas de différence dans l'expression de cette protéine. Cela semble indiquer une modification de l'activité de cette enzyme plutôt qu'un changement dans son expression. En effet, les patients HTAP présentent un état inactif de la eNOS par une phosphorylation inhibitrice (Thr495) plus importante comparée aux contrôles (Ghosh et al., 2016).

Le double effet du NO sur les CMLs (relaxation et réduction de la prolifération et de la migration) fait de ce médiateur et de sa voie de signalisation, des cibles privilégiées dans le traitement de l'HTAP. Cependant, le coût élevé et la difficulté de la mise en œuvre de prise régulière de NO inhalé réduit fortement son utilisation (Chester et al.). De plus, de nombreux patients ne répondent pas au NO et un phénomène de désensibilisation est fréquemment observé (Salguero and Cummings, 2002). Malgré cela, les autres acteurs de la voie tels que la GC, le GMPc ou la PDE5 ont été la cible du développement thérapeutique pour l'HTAP. Dans ces acteurs importants, les phosphodiésterases jouent un rôle majeur et font aujourd'hui parti des cibles de choix de l'HTAP.

Les phosphodiésterases sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons phosphodiésters. Elles sont responsables de la transformation de l'AMPc/GMPc (forme active) en AMP/GMP (forme inactive). Ces enzymes sont exprimées par les CMLs et permettent d'inhiber la cascade de signalisation du NO en dégradant le GMPc ou l'AMPc en GMP ou AMP respectivement et mettent ainsi fin à la relaxation des cellules (Figure 25).

L'inhibition de ces enzymes dans le cas des patients HTAP permet donc de conserver une activation constitutive de la voie vasorelaxante du NO et ainsi permet d'améliorer les paramètres hémodynamiques. Par ailleurs, l'expression et l'activité de certaines de ces

enzymes sont modifiées dans l'HTAP. En effet, l'expression et l'activité de la PDE5 sont augmentées dans des modèles animaux (hypoxie chronique) (Sebkhi et al., 2003), ainsi que chez l'Homme dans les CMLs d'artères pulmonaires (Wharton et al., 2005). Par ailleurs l'inhibition de la PDE5 induit une diminution de la prolifération des CMLs, ce qui en fait donc un bon outil thérapeutique (Wharton et al., 2005).

Chez le rat, les inhibiteurs des PDE tel que le sildenafil, le vardenafil ou le tadalafil induisent une vasorelaxation des artères pulmonaires de manière dose dépendante (Tsai et al., 2006). D'autres PDEs sont dérégulées de la même manière. En effet, les 4 isoformes de la PDE4 (A, B, C et D) sont plus fortement exprimées dans les CMLs de patients HTAP. L'inhibition de la PDE4 par différentes molécules (roflumilast, rolipram et cilomilast) induit une diminution de la prolifération des CMLs d'artères pulmonaires des patients HTAP. Concernant la PDE3, (Murray et al., 2002) ont observé une augmentation de l'expression de l'ARNm des PDE3A et PDE3B dans les artères pulmonaires de rat exposés à l'hypoxie chronique, mais également chez les CML de patients HTAP.

Par ailleurs, le tolafentrine qui inhibe les PDE3 et PDE4, induit une diminution des pressions dans l'artère pulmonaire, une diminution du remodelage vasculaire ainsi qu'une diminution de l'hypertrophie cardiaque droite chez le modèle de rat MCT (Pullamsetti et al., 2011).

La PDE1 est également augmentée chez les CMLs de patients HTAP et l'inhibition de cette dernière induit une accumulation intracellulaire d'AMPc et réduit la prolifération cellulaire (Murray et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés dans plusieurs modèles animaux (souris en hypoxie chronique et rat exposé à la MCT) (Schermuly et al., 2007).

Dans le modèle MCT, l'expression des PDE7 et 10 est augmentée et la PDE8 est diminuée. L'inhibition pharmacologique (papaverine) de la PDE10 comme pour la PDE1 permet de diminuer la prolifération des CMLs ainsi que d'augmenter significativement le taux d'AMPc intracellulaire (Tian et al., 2011).

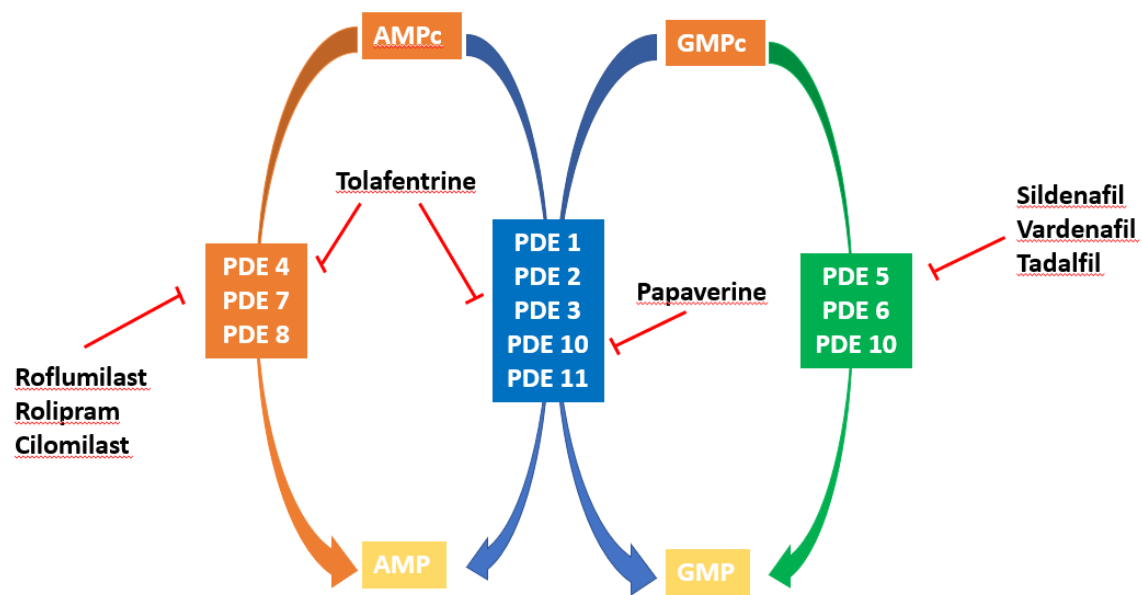


Figure 25: Spécificité des phosphodiestérasés pour l'AMPc et/ou le GMPc ainsi que certains de leurs inhibiteurs connus.

6-2-2 Les prostacyclines

La prostacycline PGI₂ a une origine identique que le TXA₂, c'est un dérivé de l'acide arachidonique. Il présente cependant un effet opposé, le TXA₂ étant vasoconstricteur et un activateur de l'agrégation plaquettaire. La PGI₂ est synthétisée constitutivement par l'endothélium mais sa production est augmentée en cas de contrainte physique au niveau du vaisseau (shear stress) (Russell-Puleri et al., 2017) ou après stimulation par les plaquettes par l'intermédiaire de l'enzyme prostacycline synthase (Caughey et al., 2001).

Les patients HTAP présentent une diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de la prostacycline synthase (Tuder et al., 1999) entraînant une diminution de la production de prostacycline. Par ailleurs le taux d'AMPc mesuré dans les artères pulmonaires de rats est également diminué dans le modèle d'HTP hypoxique (MacLean et al., 1996). L'équilibre dans la synthèse qui existe en condition physiologique entre les facteurs vasoconstricteurs (TXA₂) et vasodilatateurs (prostacycline) est perdu, en faveur d'une vasoconstriction excessive et une diminution des prostacyclines chez les patients HTAP.

6-3 Autres effets des facteurs vasoactifs

En plus de leur action sur le tonus vasculaire, les molécules vasoactives ont une action sur le contrôle de la prolifération du muscle lisse vasculaire. Dans l'HTAP, la baisse de la stimulation

des CMLs par le NO contribue à une prolifération cellulaire accrue (Tonelli et al., 2013). A l'inverse, la surproduction de l'endothéline-1 qui se fixe sur son récepteur ET-A majoritairement exprimé par les CMLs va induire l'activation de la voie des MAP Kinases (ERK 1/2) (Bouallegue et al., 2013). L'endothéline-1 possède également une action inhibitrice sur la voie BMPRII avec une diminution de l'activation de la voie SMAD 1/5/9 et une augmentation de la voie P38 induisant la prolifération des CMLs d'AP (Maruyama et al., 2015). L'ET-1 peut également se fixer sur le récepteur ET-B exprimé à la fois par les CMLs et les CEs. L'activation d'ET-B sur les CMLs induit une vasoconstriction (Seo et al., 1994) alors que sur les CEs, l'ET-B stimule une production locale de NO et de prostacycline qui favorise une vasodilatation (de Nucci et al., 1988).

7- Inflammation

Alors que l'inflammation joue un rôle évident dans le développement des HTAP associées à des maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes comme le VIH, les connectivites ou encore les infections à la schistosomatose (Asherson, 1990; Sitbon et al., 2008; Tuder, 2009), elle semble aussi jouer un rôle dans les formes héréditaires et idiopathiques.

Cette inflammation est caractérisée entre autres par une augmentation des niveaux de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires circulantes et pulmonaires, un recrutement périvasculaire anormal de diverses populations de leucocytes ainsi que par des signes d'auto-immunité dans le poumon.

Cependant, bien qu'une inflammation pulmonaire et systémique accrue est associée à l'HTAP, il est difficile de dire si l'inflammation est une cause ou une conséquence de cette maladie. En effet, l'inflammation pourrait initier le remodelage vasculaire ou être une réponse à la souffrance cellulaire induite notamment par les altérations hémodynamiques au sein du lit vasculaire pulmonaire. Cependant, les formes d'HTAP associées à des maladies auto-immunes indiquent que l'inflammation semble être un initiateur de la maladie notamment en favorisant l'apoptose des CEs tout en sélectionnant des clones résistants à l'apoptose (Price et al., 2012a).

7-1 Observations histopathologiques de l'inflammation dans l'HTAP

Au niveau histologique, on note systématiquement dans les poumons de patients atteints d'HTAP ou les poumons issus des modèles animaux de la maladie, la présence d'infiltrats

inflammatoires à proximité des vaisseaux pulmonaires remodelés. Ces infiltrats sont composés de plusieurs types cellulaires, notamment de Lymphocytes B, Lymphocytes T et de macrophages (Jonigk et al., 2011; Tuder et al., 1994). Ces recrutements inflammatoires périvasculaires ont également été observés dans des HTAP associées à une connectivité (Mathai and Hassoun, 2012). Cette composante inflammatoire similaire entre ces deux types d'HTAP très différentes suggère qu'elle constitue un mécanisme impliqué dans la physiopathologie propre de l'HTAP et pas seulement à la maladie inflammatoire associée. D'autres types cellulaires ont été retrouvés dans ces infiltrats inflammatoires, notamment des cellules dendritiques et des monocytes (Rabinovitch et al., 2014; Stacher et al., 2012). De plus, la formation de follicules lymphoïdes tertiaires, connectés aux vaisseaux lymphatiques et à proximité d'artères pulmonaires remodelées traduisent l'implication d'une auto-immunité locale dans la physiopathologie de l'HTAP (Perros et al., 2012; Tuder et al., 1994). Enfin, des cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes/autoantigènes) ont été retrouvées dans l'adventice et la média d'artères pulmonaires humaines de patients atteints d'HTAP et pourraient favoriser cette immunité adaptative pathologique (Perros et al., 2007a).

Parallèlement, la dysfonction endothéliale présente dans l'HTAP va participer à l'infiltration leucocytaire anormale. En effet, la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale va permettre aux facteurs vasoactifs, inflammatoires et prolifératifs de rentrer en contact avec la couche médiale et adventitielle des vaisseaux pulmonaires. De plus, les mécanismes de contrainte physique ainsi que les médiateurs de la coagulation tels que la thrombine ou de l'inflammation peuvent contribuer à l'altération de l'intégrité de la monocouche endothéliale vasculaire via un effet négatif sur les jonctions inter-cellulaires (Bogatcheva et al., 2002) et ainsi favoriser encore plus l'infiltration de cellules de l'inflammation.

7-2 Cytokines et chimiokines

L'augmentation dans la production et la sécrétion de molécules inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines induit le recrutement anormal de cellules inflammatoires observé dans l'HTAP. Ces molécules comme l'IL-1 β , l'IL-6, CCL-2/MCP-1, CXCL3/Fractalkine ou encore CCL5/RANTES sont augmentées dans le poumon mais également dans le sérum dans patients HTAP (Balabanian et al., 2002; Dorfmueller et al., 2002; Huertas et al., 2014; Humbert et al., 1995; Sanchez et al., 2007). Ces molécules inflammatoires participent à la stimulation des cellules inflammatoires et permettent ainsi un entretien de l'inflammation autour des

vaisseaux pulmonaires. En effet, le niveau sérique d'IL-6 est corrélé avec le pronostic des patients atteints d'HTAPi (Soon et al., 2010). Similairement, chez la souris, une surexpression de l'IL-6 induit le développement spontané d'une HTP (Steiner et al., 2009) et inversement, des souris qui n'expriment pas d'IL-6 sont résistantes à l'induction d'une HTP (Savale et al., 2009). L'axe IL-6/IL-21 semble être très important dans le développement de l'HTAP. En effet, Hashimoto-Kataoka et son équipe ont montré que l'IL-6 stimule la différenciation des lymphocytes T (LT) naïfs en lymphocytes TH17 qui sécrètent de l'IL-17 et de l'IL-21. L'IL-21 est impliqué dans la maturation des macrophages alvéolaires en macrophage M2. Les macrophages constituent les premiers éléments de défense contre des agents pathogènes et participent à la régulation de la réponse immunitaire. A proximité d'une zone lésée enflammée, les macrophages circulants se différencient soit en macrophages M1 ou M2. Les M1 sont caractérisés par un phénotype pro-inflammatoire avec une production de NO alors que les M2 présentent une activité de remodelage de la matrice en favorisant la prolifération des CMLs sans production de NO. C'est pourquoi la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 est plus délétère car elle promeut un remodelage vasculaire important (Ruffell et al., 2009; Xi et al., 2019). Par ailleurs, le nombre de ces macrophages M2 est anormalement élevé dans les poumons de patients atteints d'HTAPi mais également dans le modèle de souris soumis à une hypoxie chronique (Hashimoto-Kataoka et al., 2015; Vergadi et al., 2011). De plus, les souris soumises à une hypoxie chronique traitées avec un anticorps ciblant le récepteur à l'IL-6 (IL-6 ST) deviennent résistantes à l'induction d'une HTP. Toutes ces informations en faveur d'une forte implication de l'IL-6 dans le développement fait de cette cytokine une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'HTAP (Pullamsetti et al., 2018; Tamura et al., 2018). En plus de leur rôle pro-inflammatoire, les cytokines vont également agir sur les cellules vasculaires. En effet, la prolifération et la migration des CEs et les CMLs vont être stimulées car elles possèdent des récepteurs aux interleukines (Sanchez et al., 2007). En réponse à cette stimulation, les cellules endothéliales vont produire des cytokines tel que MCP-1 et RANTES (Dorfmueller et al., 2002; Perros et al., 2007b; Sanchez et al., 2007; Steiner et al., 2009). Ces cytokines vont stimuler la migration des macrophages, des monocytes, des lymphocytes T, des éosinophiles entre autres (Balabanian et al., 2002) et les chimiokines ont un rôle dans l'attraction et donc de recrutement des leucocytes au niveau du site inflammatoire. La rupture de la barrière endothéliale retrouvée dans l'HTAP et

l'augmentation de la production des chimiokines vont permettre et faciliter leur action de recrutement inflammatoire.

7-3 Auto-immunité et HTAP

Dans l'HTAP, la présence anormale d'anticorps dirigés contre les cellules du soi (fibroblastes, cellules endothéliales) est retrouvée dans 30 à 50% des HTAPi ainsi que des patients atteints d'une HTAP associée à une sclérodémie systémique (SSC) (Salojin et al., 1996). Ces anticorps dirigés contre les fibroblastes vont être responsables de leur activation en fibroblastes producteurs de collagène qui participent directement au remodelage vasculaire (Li et al., 2017). Les anticorps dirigés contre les cellules endothéliales vasculaires induisent l'apoptose de ces cellules (Li et al., 2017) ainsi que l'expression de protéines d'adhésion leucocytaire qui permet le recrutement de cellules inflammatoires au niveau vasculaire (Arends et al., 2013).

7-4 Agents immunosuppresseurs dans l'HTAP

Des études chez l'animal ont montré que le traitement de l'HTAP par des molécules immunomodulatrices ou anti-inflammatoires/immunosuppressives (antagonistes des récepteurs à l'IL-1, glucocorticoïdes) réduisait la sévérité de la maladie mais également augmentait la survie des animaux (Price et al., 2012b).

C'est pourquoi un premier essai clinique avec des glucocorticoïdes a été réalisé sur 28 patients atteints d'HTAP en 2006, dont 8 patients associés à une sclérodémie (Groupe 1), 12 patients avec un lupus érythémateux (Groupe 2) et 8 patients associés à une connectivite (Groupe 3) (Sanchez et al., 2006). Parmi les 28 patients de l'étude, 8 ont répondu (0/8 du groupe 1, 5/12 du groupe 2 et 3/8 du groupe 3) au traitement (Sanchez et al., 2006).

Ces résultats encourageants obtenus sur l'Homme et les modèles animaux ont rapidement entraîné la mise en place d'autres essais cliniques visant à cibler l'inflammation dans l'HTAP. En 2014, 3 essais cliniques ont été mis en place afin de tester des molécules thérapeutiques visant NFAT, les cellules CD20+ (Lymphocytes B) ou l'IL-1 chez des patients atteints d'HTAP. Plus récemment, un essai clinique a permis d'étudier l'effet d'un antagoniste de l'IL-6 (Tocilizumab) sur environ 20 patients atteints d'HTAP (Hernández-Sánchez et al., 2018). Dans cet essai, il a déjà été reporté des cas de régression de l'HTAP chez des patients où la part inflammatoire est très importante dans le développement de la maladie (lupus érythémateux disséminé, syndrome du tissu conjonctif mixte ou maladie de Castleman) (Arita et al., 2010; Cabrera et al., 2016).

8- Défaillance cardiaque droite

Lorsque le sang est éjecté du ventricule vers les artères, la contraction est contrainte à une force de résistance appelée postcharge. Cette dernière est dépendante de la résistance des artères, normalement faible dans le système pulmonaire. Cependant, dans l'HTAP, le remodelage des artères induit une augmentation des résistances ce qui augmente la postcharge du ventricule droit (VD). Le VD doit donc développer une force de contraction plus importante pour lutter contre cette augmentation de la postcharge et garder le même volume d'éjection systolique. Avec cette augmentation de force de contraction, le VD réclame plus d'énergie et d'oxygène pour fonctionner correctement. A long terme, cette augmentation du travail contractile va conduire à une hypertrophie du VD (HVD).

Cette augmentation de masse du VD va aider à compenser l'augmentation de la pression et au maintien d'un débit cardiaque normal. Cependant, il existe une hétérogénéité dans l'HVD où il faut différencier les HVD adaptatives et les HVD non adaptatives. En effet, tous les patients n'évoluent pas de la même manière. Certains patients restent stables avec un débit cardiaque préservé malgré l'augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire alors que d'autres patients décompensent rapidement jusqu'à l'insuffisance cardiaque droite (Ryan and Archer, 2014).

La réponse adaptative est caractérisée par une hypertrophie concentrique avec une faible dilatation et peu de fibrose ainsi qu'une fraction d'éjection du ventricule droit (FEVD) et un débit cardiaque normal (Ryan and Archer, 2014). A l'inverse, les patients atteints d'HTAP avec une réponse non adaptative présentent une dilatation et de la fibrose dans le VD avec une réduction de la FEVD et du débit cardiaque (Vonk-Noordegraaf et al., 2013). Ces différences fonctionnelles sont accompagnées de différences moléculaires. En effet, les cœurs non adaptés présentent une dérégulation de plusieurs voies métaboliques (diminution de la phosphorylation oxydative au profit de la glycolyse), de l'angiogenèse (diminution de l'expression de gènes pro-angiogéniques tels que VEGF, IGF-1, APLN ou Angiopoietine-1) ainsi que de la réponse β -adrénergique (diminution de l'expression des récepteurs α et β adrénergiques dans les myocytes) (Assad and Hemnes, 2015; Bristow and Quaife, 2015; Ryan and Archer, 2014). La glycolyse anaérobie, qui produit 2 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose, est privilégiée et entraîne une production d'énergie plus faible que la phosphorylation oxydative, où un glucose produit 36 molécules d'ATP, ce qui diminue l'apport

énergétique du cœur (Archer et al., 2013; Piao et al., 2013). Il a également été montré une dysfonction mitochondriale dans le VD des patients atteints d'HTAP. En effet, les mitochondries produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en grande quantité et cette augmentation de la production de ROS par les mitochondries est responsable de la stabilisation de HIF-1 α (Redout et al., 2007). En effet, HIF-1 α est une protéine très instable et rapidement dégradée par des enzymes sensibles à la concentration en oxygène. Ces enzymes sont les protéines à domaine prolyl hydroxylase (PHD) et l'asparagine hydroxylase FIH (Factor Inhibiting HIF) (Hagen, 2012). En hypoxie, la mitochondrie produit des ROS et ces molécules vont permettre la stabilisation de HIF-1 α en inhibant les enzymes PHD et FIH (Hagen, 2012). Par ailleurs Bogaard et al, montrent que la stabilisation et la forte expression de HIF-1 α amènent à une activation constitutive d'Akt (Bogaard et al., 2009). A court terme, cette activation conduit à une expression du VEGF, une hypertrophie cardiaque et une néo-angiogenèse (Bogaard et al., 2009). Cependant, une activation de cette voie de manière constitutive et répétée est associée à une dilatation cardiaque, une diminution de l'expression du VEGF, une diminution de l'angiogenèse et une raréfaction capillaire (Bogaard et al., 2009). Cette altération de l'angiogenèse peut contribuer à l'apparition d'une ischémie et favoriser la défaillance du cœur droit.

Enfin, il est intéressant de noter qu'il existe également des différences de fonction ventriculaire droite entre les patients atteints d'HTAP mutés *BMPR2* et les patients non mutés. Bien que ces deux groupes de patients présentent des PAPm et des résistances vasculaires pulmonaires similaires, la FEVD et le débit cardiaque sont plus diminués chez les patients mutés *BMPR2* comparé aux patients ne présentant pas cette mutation, ce qui suggère que l'altération de la voie *BMPR2* peut accentuer la dysfonction cardiaque (van der Bruggen et al., 2016). De plus, les rats mutés sur le gène *Bmpr2* présentent des altérations au niveau des cardiomyocytes du ventricule droit indépendamment de la présence d'HTAP. En effet, les cardiomyocytes de ces animaux sont plus petits, présentent une réserve calcique du réticulum sarcoplasmique plus petite et un potentiel d'action plus court en comparaison aux rats non mutés (Hautefort Aurélie et al., 2019).

CHAPITRE 5 : Traitements de l'HTAP

1-1 Les analogues de la prostacycline

Les traitements visant à compenser la carence en prostacyclines sont aujourd'hui parmi les plus efficaces car ils agissent sur de très nombreux processus cellulaires (Figure 27). La molécule phare de cette classe thérapeutique est l'époprosténol. C'est un analogue synthétique de la PGI₂ qui améliore la capacité à l'effort, les fonctions hémodynamiques, la sévérité des symptômes ainsi que la survie des patients (Sitbon and Vonk Noordegraaf, 2017; Sitbon et al., 2002a). En effet, l'étude de (Sitbon et al., 2002b) démontre que les patients traités à l'époprosténol présentent un taux de survie de 85%, 70%, 63% et 55% à un, deux, trois et cinq ans respectivement alors qu'elle était de 50% à 2.8 ans avant l'avènement des thérapies spécifiques (Humbert et al., 2004).

Un autre analogue de la prostacycline utilisé dans le traitement de l'HTAP est le tréprostinil. Il est administré par voie sous-cutanée. Cette molécule va préférentiellement se fixer sur les récepteurs aux prostaglandines de type D et E ainsi qu'aux récepteurs aux prostacyclines. En activant ces récepteurs sur les CMLs, il y a une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc qui permet aux canaux potassiques sensibles au calcium de s'ouvrir, ce qui induit une hyperpolarisation des CMLs et cause une vasodilatation (Lindegaard Pedersen et al., 2019). Ce traitement améliore les paramètres hémodynamiques des patients HTAP et réduit la dyspnée. Cependant, il y a de fortes possibilités d'infection et de douleurs au niveau du site d'injection (Coons et al., 2019). La dernière molécule de cette classe de médicament est le selexipag. C'est un nouvel agoniste de la prostacycline administrée par voie orale. Il possède une forte affinité pour le récepteur à l'inositol phosphate de la prostacycline ce qui a pour conséquence de diminuer les effets secondaires observés avec les autres analogues de la prostacycline. Cette molécule induit chez les patients HTAP une vasodilatation, une inhibition de l'agrégation plaquettaire ainsi qu'une diminution de l'inflammation (Noel et al., 2017). Cependant, des effets secondaires persistent avec des maux de têtes, diarrhées, nausées, des rougeurs ainsi que des douleurs à la mâchoire. De plus, l'efficacité de ce traitement sous d'autres formes d'administration (autre que IV et SC) reste à être évaluée (Coons et al., 2019).

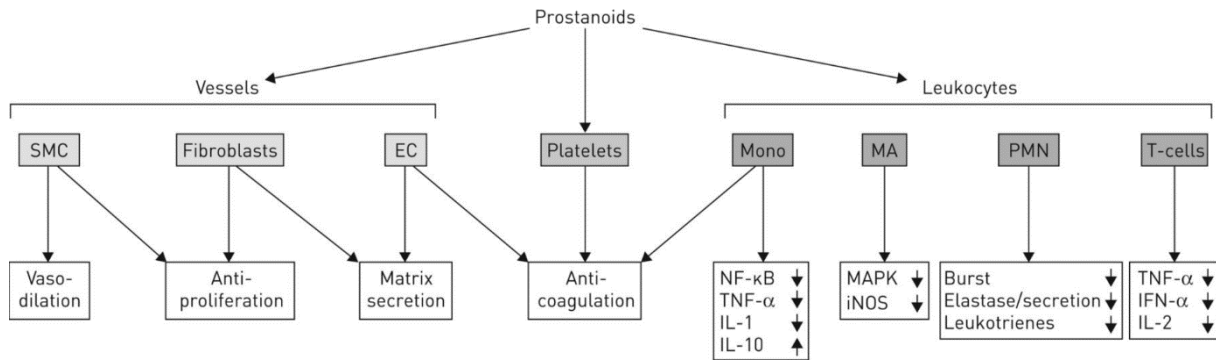


Figure 27: Schéma récapitulant les effets moléculaires de l'époprostenol chez l'Homme (d'après Sitbon et Vonk Noordegraaf, 2017).

1-2 Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1

Ce type de traitement permet d'inhiber l'effet vasoconstricteur de l'endothéline-1 par compétition avec les récepteurs ET-A et ET-B. Actuellement, 3 antagonistes des récepteurs de l'endothéline sont sur le marché : Le bosentan, l'ambrisentan et le macitentan. Le bosentan et le macitentan ciblent les 2 récepteurs ET-A et ET-B. Le principal effet secondaire du bosentan est une dysfonction hépatique réversible à l'arrêt du traitement.

L'ambrisentan lui, cible spécifiquement le récepteur ET-A qui possède un effet vasoconstricteur sans affecter le récepteur ET-B qui lui présente une activité vasodilatatrice. L'ambrisentan possède une durée de vie plus longue que le bosentan et n'a pas d'effet secondaire sur le foie. Cependant, la spécificité de ce traitement ne semble pas avoir d'effet bénéfique plus important que les deux autres (Humbert et al., 2014). Ces traitements ont démontré une amélioration des capacités physiques, des paramètres hémodynamiques ainsi qu'un délai augmenté avant l'aggravation clinique (Galiè and Branzi, 2005; Klinger et al., 2011).

1-2 Les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5

L'inhibition de la PDE-5 par les inhibiteurs pharmacologiques tel que le Sildenafil, Vardenafil et Tadalafil va induire une augmentation de la concentration intracellulaire en GMPc en inhibant sa dégradation en GMP et augmente l'activité de la PKG. De la même manière, l'inhibition de la dégradation de l'AMPc en AMP par le Sildenafil permet de maintenir l'activité de la PKA (Barnett and Machado, 2006). L'ensemble de ces effets moléculaires permettent une vasorelaxation combinée à une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses via l'activité de la PKA et la PKG (Figure 28).

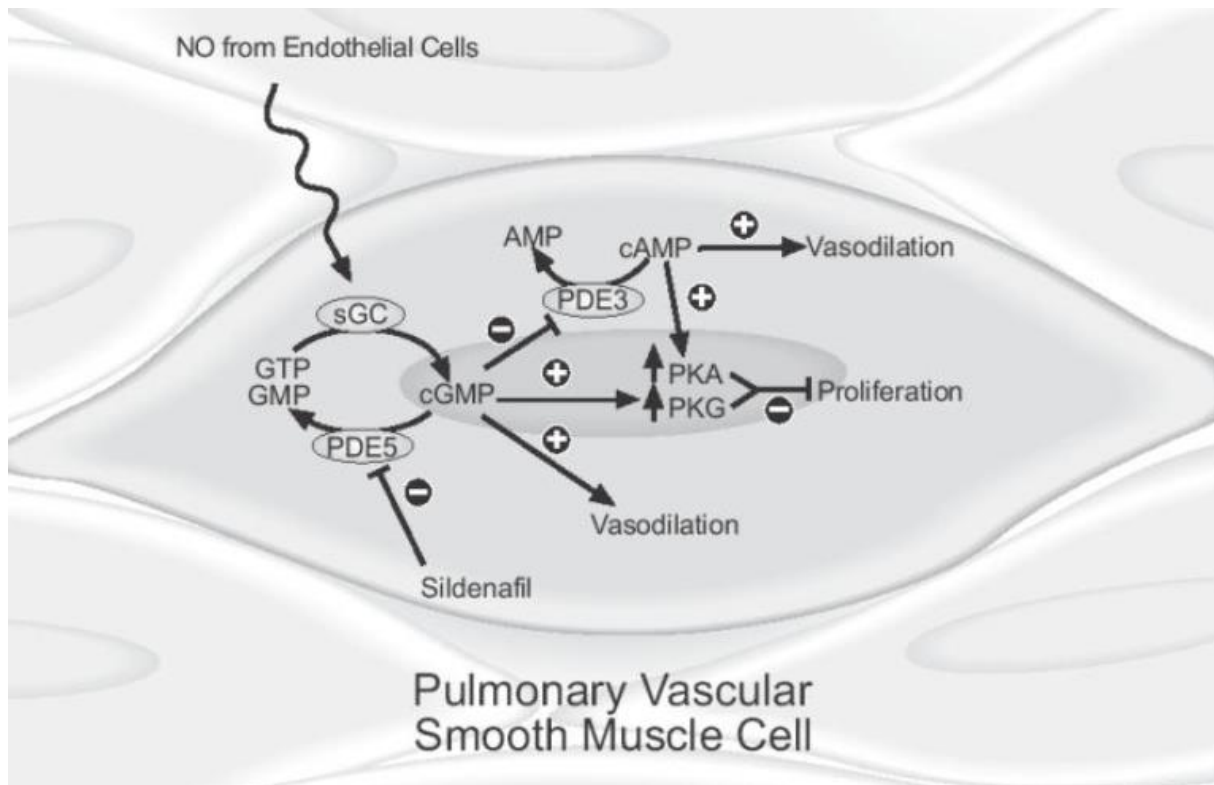


Figure 28 : Schéma des effets moléculaires de l'inhibition des PDE sur les cellules musculaires lisses vasculaires (d'après Barnett et Machado, 2006).

Il a également été montré que ces inhibiteurs augmentent l'expression des canaux potassiques à la membrane des CMLs (Montani et al., 2013). L'activité de ces canaux potassiques permet ainsi de diminuer le potentiel membranaire et ainsi limiter la dépolarisation des cellules nécessaires à la vasoconstriction.

L'efficacité des 3 molécules est claire avec une amélioration des capacités physiques, des paramètres hémodynamiques ainsi qu'un allongement du délai d'aggravation clinique avec des effets secondaires mineurs (Galiè et al., 2009, 2016).

1-3 L'activateur de guanylate cyclase soluble (GCs)

Le Riociguat est une molécule qui stabilise la liaison entre le NO et la sGC mais également stimule l'activité de la guanylate cyclase indépendamment du NO ce qui augmente la concentration intracellulaire en GMPc (Lian et al., 2017). Son administration aux patients atteints d'HTAP permet d'améliorer les capacités physiques à l'exercice, les paramètres hémodynamiques ainsi que les résistances vasculaires pulmonaires (Lian et al., 2017). Il est utilisé pour les patients atteints d'hypertension pulmonaire post-embolique inopérable ou

chez les patients atteints d'HTAP (Lau et al., 2017). Les principaux effets secondaires sont une nasopharyngite ainsi que des œdèmes périphériques (Halank et al., 2017).

1-4 Les inhibiteurs des canaux calciques

La prescription d'un traitement à base d'inhibiteur des canaux calciques n'est possible qu'à une faible population de patients d'HTAP dits « répondeurs » (réponse définie par une diminution de la PAPm de 10 mmHg minimum et inférieur à 40 mmHg et un débit cardiaque normal ou élevé) représentant 10% des patients atteints d'HTAP (Naeije and Vachiéry, 2001).

1-5 Molécules en essais cliniques

Actuellement, des essais cliniques sont en cours sur des nouvelles molécules pour les patients atteints d'HTAP.

CXA-10 : Cette molécule appartient à une nouvelle classe pharmacologique appelée acides gras nitrés. Elle joue un rôle sur des protéines tel que Nrf2, NF-κB ou TLR4 et sont donc impliqués dans des processus cellulaires tels que le métabolisme et l'inflammation (Schopfer et al., 2018).

Un essai clinique (NCT04125745) est actuellement en Phase II aux Etats-Unis et les études pré-cliniques indiquent que le CXA-10 augmente l'expression de la protéine anti-inflammatoire Nrf2 tout en inhibant la protéine pro-inflammatoire NF-κB. Elle réduit également le stress oxydatif en modulant l'expression des HeatShock Protein (HSP).

A l'heure actuelle, cette molécule semble avoir des effets positifs sur des biomarqueurs associés à l'inflammation et à la fibrose.

Apabetalone : La protéine BRD4 (Bromodomain Containing Protein 4) joue un rôle dans le développement de l'HTAP car son inhibition réduit le remodelage vasculaire pulmonaire dans plusieurs modèles animaux (Tang et al., 2013). De plus, il a été montré *in vitro* que le composé JQ1, un inhibiteur des bromodomains de BET (bromodomain extraterminal domain) et de BRD4 en particulier, diminue la prolifération des cellules endothéliales pulmonaires humaines et diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) (Mumby et al., 2017). En effet, la protéine BRD4 serait capable de déclencher des processus comme la calcification et le remodelage vasculaire en régulant l'expression de lipoprotéines et de facteurs inflammatoires (Khan et al., 2014). C'est pourquoi, la molécule Apabetalone, un inhibiteur de BRD4 est aujourd'hui en essai clinique de Phase I au Canada (NCT03655704).

Sotatercept : La perte de la voie BMPR2 au profit de la voie du TGF- β est une altération cellulaire commune à beaucoup de formes d'HTAP. Le Sotatercept est une molécule qui va lier et séquestrer dans le milieu extracellulaire les ligands connus pour se fixer sur les récepteurs du TGF- β (activines, GDFs). Cela va permettre d'empêcher l'activation de la voie du TGF- β sans affecter la voie BMPR2 et ainsi permettre de récupérer une balance normale entre ces deux voies et ainsi restaurer l'homéostasie vasculaire (Yung Lai-Ming et al., 2018).

Cette molécule très prometteuse est actuellement en essai clinique de Phase II aux Etats-Unis (NCT03738150).

2- Traitements de support non spécifiques de l'HTAP

En plus des traitements spécifiques de l'HTAP, des traitements dits de support peuvent être prescrits pour réduire au mieux les insuffisances respiratoires et cardiaques des patients.

2-1 Les anticoagulants oraux

Des anticoagulants sont dans la plupart du temps prescrits aux patients atteints d'HTAP qui présentent un risque de thrombose dû au flux sanguin pulmonaire diminué, la dilatation du ventricule droit ainsi qu'à la sédentarité des patients (Naeije and Vachiéry, 2001).

2-2 Les diurétiques

Les diurétiques sont prescrits en cas d'insuffisance cardiaque droite et de rétention hydrosodée. Ce traitement permet de diminuer les signes de surcharge ventriculaire droite et améliore les symptômes du patient.

2-3 L'oxygénothérapie

Les patients atteints d'HTAP peuvent présenter une hypoxémie de repos. Dans ce cas, une oxygénothérapie est prescrite pour retrouver une saturation d'oxygène dans le sang convenable.

CHAPITRE 6 : Les modèles animaux d'hypertension artérielle pulmonaire (HTP)

1- Modèles toxiques

De nombreux modèles animaux d'HTAP ont été développés et miment certains aspects de la physiopathologie humaine. Les principaux modèles d'HTAP sont développés chez le rat et la souris cependant des modèles sur des gros animaux comme le porc ou le veau sont également utilisés.

1-1 Le modèle d'HTP induite chez le rat par exposition à la monocrotaline

La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde pyrrolizidine toxique extrait d'une plante (*Crotalaria spectabilis*). La MCT est bioactivée dans le foie par les cytochromes P4503A en MCT pyrrole qui va être transportée dans la circulation sanguine et induire une toxicité cardiopulmonaire. L'induction de l'HTP par la MCT se fait par une injection unique de MCT à 60mg/kg en sous-cutanée. L'HTP se développe de façon progressive de 14 à 28 jours.

La MCT est responsable d'une agression de l'endothélium accompagnée d'une forte inflammation péri-vasculaire. Ce modèle d'HTP est un des modèles les plus couramment utilisé car ces rats présentent une HTP sévère au niveau hémodynamique et histologique. En effet, il y a une augmentation significative de la PAPm > à 35 mmHg contre 15 mmHg pour un contrôle avec le développement d'une hypertrophie cardiaque droite (Piao et al., 2010). Ce modèle présente également une hypertrophie de la média des petites artères pulmonaires, une néo-muscularisation des artères distales non muscularisées, un dommage de l'endothélium et une inflammation vasculaire (Wilson et al., 1989). Cependant, bien que les artères pulmonaires de petit calibre soient affectées, on ne rencontre pas de lésions plexiformes dans ce modèle. Les altérations moléculaires du modèle MCT ont été considérablement étudiées. Par exemple, les effets de la MCT sur l'endothélium induit un dommage de l'ADN (Wagner et al., 1993), une altération de la voie du NO, ainsi qu'une sécrétion anormale de facteurs pro-prolifératifs. Ce modèle est sujet à controverse étant donné son type d'induction et les nombreuses thérapies expérimentales induisant des effets hémodynamiques bénéfiques. Cependant, le modèle MCT reste un modèle reproductible, simple et avec certaines similarités avec l'HTAP humaine au niveau moléculaire cellulaire et histologique (Xiong et al., 2018).

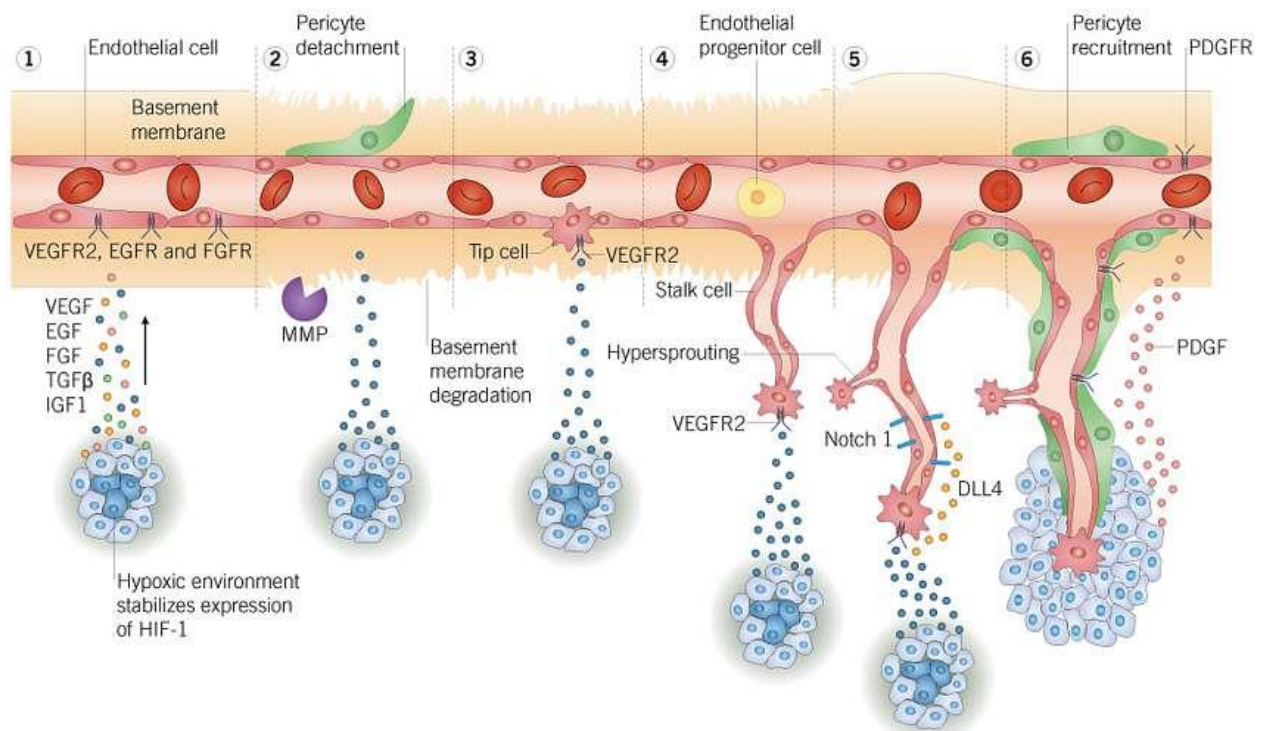
1-2 Le modèle d'HTP induite chez le rongeur (rat et souris) par hypoxie chronique

Ce modèle repose sur l'exposition à l'hypoxie (10% O₂ et <0,5% de CO₂) chronique pendant 3 semaines. Ce modèle d'HTP est peu sévère avec un remodelage vasculaire moyen et sans décès des animaux dû à l'insuffisance cardiaque droite comme dans le modèle MCT (Morrell et al., 1997). C'est un modèle réversible en quelques semaines lorsque les animaux sont remis en normoxie (Ryan et al., 2011). Il existe une variabilité importante de la réponse à l'hypoxie suivant l'espèce utilisée. La souris, le lapin et le cobaye répondent faiblement à l'hypoxie. Le rat fait partie des répondeurs modérés alors que le veau et le cochon sont très sensibles à l'hypoxie. La réponse à l'hypoxie est également affectée par l'âge. Les animaux jeunes encore en croissance sont plus sensibles que les animaux adultes.

Au niveau des changements histologiques, il y a une muscularisation des artérioles normalement non muscularisées (Ryan et al., 2013). Le remodelage est limité à une hypertrophie médiale et adventitielle ce qui correspond aux HTP du groupe 3. Ce modèle est moins représentatif des lésions vasculaires d'un point de vue histologique que le modèle MCT.

1-3 Le modèle d'HTP induite chez le rongeur par l'hypoxie + Sugen 5416 (SuHx)

Ce modèle d'HTP est induit par une injection unique de SU5416 à 20mg/kg suivie d'une exposition à l'hypoxie chronique (10% d'O₂) pendant 2 à 3 semaines. Le SU5416 est un antagoniste du récepteur au VEGF (VEGFR1 et VEGFR2). Le VEGF est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire important dans le processus de l'angiogenèse (Guo et al., 2018) (Figure 29). Ce protocole induit un modèle sévère d'HTP chez le rat avec un développement de l'HTP progressif allant jusqu'à 9 à 12 semaines. Il est caractérisé par un remodelage intense des APs dont des lésions similaires aux lésions plexiformes humaines (Toba et al., 2013).



1. Hypoxia	2. Proteolytic degradation	3. Tip cell migration	4. Tube formation	5. Regulation of vessel size	6. Tumor vascularization
Hypoxia induces HIF-1 expression and the consequent release of pro-angiogenic factors, of which VEGF is the most important	Hypoxia also upregulates protease expression, leading to basement membrane degradation and pericyte detachment	Specialized endothelial cells – 'tip cells' – migrate along angiogenic factor gradient	Endothelial cells are differentiated into highly proliferative stalk cells which make up the main body of the new vessel	VEGF stimulates DLL4 secretion which binds to Notch-1 receptors; this down regulates VEGFR suppressing proliferation	PDGFβ stimulates pericyte attachment and reduces proliferation and VEGF sensitivity. Blood supply stimulates further tumor growth

Figure 29 : Schéma détaillé du processus d'angiogenèse dans le contexte tumoral.

1-4 Autres modèles d'HTP expérimentaux

- Le modèle Fawn Hooded : Le modèle FHR est un modèle génétique affectant le stockage de sérotonine dans les plaquettes sanguines et qui est utilisé pour étudier la dépression (Rezvani et al., 1990) et l'hypertension pulmonaire que ces animaux développent spontanément (Kentera et al., 1988). Parmi les mécanismes physiopathologiques possibles, ces animaux présentent une dysfonction mitochondriale qui augmente la production de ROS et permet la stabilisation de HIF-1α en condition normoxique. HIF-1α va ensuite diminuer l'expression des canaux potassiques Kv1.5 et ainsi empêcher la vasorelaxation (Archer et al., 2008; Bonnet et al., 2006). Dans ce modèle, environ 68% des animaux (mâles et femelles) développent une HTP avec des lésions vasculaires pulmonaires.

- Le modèle MCT + pneumonectomie : l'hypothèse de base du développement de ce modèle est que l'ajout d'une contrainte hémodynamique supplémentaire (hyperdébit) sur les artères

pulmonaires lésées par la MCT aggrave les lésions induites par cette toxine (Okada et al., 1997). En effet, ce modèle est plus sévère que la MCT seule et présente des lésions proches des lésions plexiformes (White et al., 2007).

- Le modèle MCT + Hypoxie chronique : ce modèle est basé sur une injection unique de MCT (60mg/kg) combiné à 4 semaines d'hypoxie chronique. Ce modèle est plus sévère que la MCT seule avec un intense remodelage caractérisé par des lésions intimaux ainsi que des lésions plexiformes, une inflammation ainsi qu'une altération de la réactivité vasculaire pulmonaire (Nogueira-Ferreira et al., 2015).

2- Modèles génétiques

2-1 Les modèles de souris génétiquement modifiées

L'identification de mutations somatiques impliquées dans le développement de l'HTAP a entraîné la création d'un nombre important de modèles animaux d'HTAP génétiquement modifiés. Plus particulièrement, les souris génétiquement modifiées ont permis de souligner le rôle de l'altération de la voie de signalisation dépendante de BMPRII dans l'HTAP.

2-1-1. Les souris génétiquement modifiées pour le gène *Bmpr2*

L'expression et la fonction de BMPRII sont dérégulées chez les patients atteints d'HTAPh. C'est pourquoi différentes souches de souris transgéniques pour le gène *Bmpr2* ont été créées.

Trois principaux modèles de souris génétiquement modifiées sont utilisés pour étudier la voie de signalisation de BMPRII (Tableau 6).

- Il a été développé un modèle de souris hétérozygote portant une délétion de l'exon 4 et 5 du gène *Bmpr2* (perte du domaine transmembranaire et une partie du domaine kinase). Ces souris ont une diminution d'expression de 50% de la protéine BMPRII et sont caractérisées par une augmentation de la muscularisation des artères pulmonaires et une faible augmentation de la PAPm. Ces souris ne présentent pas d'hypertrophie cardiaque droite ni de différence du débit cardiaque comparé aux souris sauvages (Beppu et al., 2000; Prewitt et al., 2015)
- Long et al. ont développé une lignée possédant une mutation hétérozygote dans le domaine de la queue cytoplasmique de la protéine BMPRII identifiée chez l'homme : R899X. Ces souris ne développent pas d'HTP à 3 mois, cependant à partir de 6 mois, les mâles et les femelles développent spontanément une HTP. Cette HTP est caractérisée par une élévation de la pression ventriculaire systolique droite (PVDs) et une augmentation de la muscularisation des artères pulmonaires. Ces souris ne présentent pas d'hypertrophie cardiaque droite, pas de modification du débit cardiaque ni de la pression systémique (Long et al., 2015).
- Enfin, Délot et al, ont développé une lignée mutée avec le gène *Bmpr2* ayant une délétion hétérozygote de l'exon 2. Cette souche ne développe pas spontanément d'HTP ni d'hypertrophie cardiaque. La muscularisation à l'état basal n'a pas été évaluée dans cette souche (Délot et al., 2003).

Ces souris mutées *Bmpr2* ne développant pas ou peu d'hypertension pulmonaire de façon spontanée, elles ont été soumises à différents inducteurs d'HTP tels que l'hypoxie chronique

ou l'inflammation. Dans ces conditions, ces souris présentent une susceptibilité plus importante au développement de l'HTP par rapport aux souris sauvages.

Pour étudier l'impact de l'altération de la voie BMPRII spécifiquement dans les CMLs et les CEs d'artères pulmonaires, les souris énumérées précédemment ont été utilisées pour créer des souches portant des mutations homozygotes pour BMPRII pour un type cellulaire spécifique car les mutations ubiquitaires à l'état homozygote sont létales durant le développement (Beppu et al., 2000). De façon intéressante, tout comme les mutations hétérozygotes ubiquitaires; les mutations du gène *Bmpr2* spécifiquement au niveau des CEs ou des CMLs induisent des HTP chez les souris avec une augmentation des PVDS et une muscularisation des artères pulmonaires (Guignabert et al., 2017).

Ces souris mutées au niveau du gène *Bmpr2* sont donc des outils précieux pour étudier la dérégulation et l'impact de la voie de signalisation dépendante de BMPRII dans la physiopathologie de l'HTAP.

Cependant les souris sont plus résistantes à l'induction de l'HTP par hypoxie chronique ainsi que par la MCT comparé au rat. De plus, il est plus aisé d'effectuer des mesures hémodynamiques chez le rat que chez la souris, le ventricule droit et l'artère pulmonaire étant plus difficiles d'accès chez la souris que chez le rat. Enfin, dans les études chez la souris, le débit cardiaque est moins souvent mesuré que chez le rat.

Transgenic mouse/rat models	Tissue-specificity	Spontaneous PH	Induced PH	Provided evidences
<i>Bmp2</i> [±] mice	Ubiquitous	No	Develop more severe hypoxic PH	Changes in RVSP or RVH, or % of vascular muscularization
<i>Bmp4</i> ^{LacZ/-} mice	Ubiquitous	No	Protected from the development of hypoxic PH	Changes in RVSP or in RVH and % of vascular muscularization
<i>Smad1</i> ^{+/-} knock out mice	Ubiquitous	No	Undetermined	No changes in RVSP or RVH, or % of vascular muscularization
<i>Bmpr2</i> ^{+/-} mice	Ubiquitous	No, but mild increase in RVSP	-Develop similar degree of PH as WT mice under chronic hypoxia -Develop PH with serotonin infusion -Develop PH more severe hypoxic PH when combined with serotonin infusion, or with replication-deficient adenovirus expressing 5-lipoxygenase (Ad5LO) in lungs	Changes in RVSP, total pulmonary vascular resistance, RVH, and % of wall thickness
U6-small hairpin RNA-transgenic-BMPR2-knockdown (or <i>Bmpr2</i> KD) mice	Ubiquitous	No	Undetermined	No changes in RVSP or in vascular muscularization
<i>Bmpr2</i> ^{+;R899X} knock-in mice	Ubiquitous	Yes	Undetermined	Increase in RVSP and in the % of vascular muscularization, but no changes in RVH
<i>Bmpr2</i> ^{Δ140Ex1/+} rats	Ubiquitous	Yes	Undetermined	Spontaneous pulmonary vascular remodeling
EC- <i>Bmpr2</i> ^{-/-} mice	Endothelial specific	No	Develop more severe hypoxic PH and are less prone to reverse this hypoxia-induced PH by re-oxygenation	No changes in RVSP or RVH, % of vascular muscularization
<i>L1Cre(+);Bmpr2</i> ^{fl/fl} mice and <i>L1Cre(+);Bmpr2</i> ^{fl/+} mice	Endothelial specific	Yes with low penetrance	Undetermined	Increase in RVSP or RVH, % of vascular muscularization
<i>L1Cre(+);Smad1</i> ^{fl/fl} mice	Endothelial specific	Yes with low penetrance	Undetermined	Increase in RVSP, RVH, and % of wall thickness
<i>SM22-tet-Bmpr2</i> ^{R899X} mice	Smooth muscle specific	Yes with low penetrance	Undetermined	Increase in RVSP, and % of vascular muscularization
<i>SM22-rtTA TetO7-Bmpr2</i> ^{Δ140} [4] mice	Smooth muscle specific	Yes	Develop more severe hypoxic PH	Increase in RVSP, RVH, and % of wall thickness
<i>Bmpr2</i> ^{+;R899X} / <i>Smad1</i> ^{+/-} double knock out mice	Smooth muscle specific	Yes	Undetermined	Increase in RVSP, RVH, and % of wall thickness
<i>Tagln-Cre(+); Smad1</i> ^{fl/fl} mice	Smooth muscle specific	Yes with low penetrance	Undetermined	Increase in RVSP, RVH, and % of wall thickness

RVH: right ventricular hypertrophy; RVSP: right ventricular systolic pressure.

Tableau 6 : Liste récapitulative des modèles d'animaux transgéniques portant une mutation dans la voie BMPR2 (D'après Guignabert et al, 2017).

2-2 Les modèles de rat génétiquement modifiés

Du fait que le rat soit un meilleur modèle dans l'étude de l'hypertension pulmonaire et grâce aux outils d'édition génétique efficaces, des modèles génétiquement modifiés sur le gène *Bmpr2* ont vu le jour afin d'étudier le rôle de la mutation dans le développement de l'HTAP.

2-2-1 Les rats génétiquement modifiés sur le gène *Bmpr2*

Actuellement, deux modèles de rat mutés sur le gène *Bmpr2* ont été développés.

Le premier modèle développé par l'équipe du Dr Perros possède des animaux avec une mutation hétérozygote sur le gène *Bmpr2*. Ces animaux présentent un décalage du cadre de lecture due à une délétion de 71 paires de bases dans le premier exon du gène *Bmpr2* qui

mène à une perte du codon d'initiation (ATG). Il a été observé une haploinsuffisance (diminution de 50%) dans l'expression de la protéine BMPRII au niveau pulmonaire. De plus, ces animaux présentent plusieurs types d'altérations moléculaires au niveau pulmonaire et cardiaque.

Premièrement, ces animaux ne développent pas d'HTAP spontanée à l'âge de 3 mois, mais en revanche à partir de 6 mois, ils développent une HTAP avec une pénétrance similaire à celle observée chez l'Homme (environ 20%) (Hautefort Aurélie et al., 2019). Par ailleurs, ces animaux sont plus sensibles à des inducteurs d'HTP (Hypoxie) que les rats contrôles. De plus, ces animaux présentent une densité vasculaire plus faible, et une altération de la relaxation artérielle due à une diminution du courant KCNK3, une augmentation d'expression de l'IL-6 et un dépôt marqué de collagène périvasculaire. Enfin, la mutation *Bmpr2* affecte la fonction et la morphologie des cardiomyocytes du ventricule droit comparé aux rats sauvages (Hautefort Aurélie et al., 2019).

Ces animaux ont également permis de montrer que l'endoMT est lié aux altérations dans la voie de signalisation *Bmpr2* (Ranchoux et al., 2015a).

Un autre modèle de rat muté sur *Bmpr2* développé récemment par une équipe américaine comprend deux souches mutantes : L'une présente une délétion mono-allélique de 527 paires de bases qui chevauche l'intron et l'exon 1 et l'autre souche possède une délétion de 16 paires de bases dans l'exon 1. Les deux délétions induisent chacune un décalage du cadre de lecture et une haploinsuffisance dans l'expression protéique de BMPRII. Ils ont montré que leurs animaux ne développent pas d'HTAP spontanée, cependant ces animaux développent une HTAP sévère lorsqu'ils sont soumis à un stimulus inflammatoire (5-LO) (Tian Wen et al., 2019). A la suite de ce stimulus, il y a apparition de cellules endothéliales résistantes à l'apoptose avec une forte activité proliférative et une suractivation des voies de signalisation comme NF- κ B, IL-6 et le TGF- β qui sont bien connues dans le développement de l'HTAP (Tian Wen et al., 2019).

CHAPITRE 7 : La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO)

1- Définition de la MVO

La maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire (MVO/HCP) est une maladie cardio-pulmonaire sévère très rare. Elle est caractérisée par des lésions vasculaires dans les veinules et les capillaires mais présente également des lésions artérielles (Mandel et al., 2000; Nossent et al., 2018). Comme l'HTAP, la MVO est également caractérisée par une augmentation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 20 mmHg au repos mais également une pression artérielle pulmonaire occluse (PAPO), reflet de la pression capillaire pulmonaire (PCP) inférieure ou égale à 15 mmHg (Simonneau et al., 2019). De plus, les patients atteints de MVO présentent une obstruction du lit capillaire pulmonaire avec un épaississement des parois faisant l'interface air/sang (septas) où se produisent les échanges gazeux. C'est pourquoi ces patients présentent une très forte diminution de la DLCO (Mandel et al., 2000).

La MVO peut être de forme sporadique ou familiale. Dans sa forme familiale, la MVO est due à des mutations bi alléliques perte-de-fonction du gène *EIF2AK4* et se transmet sur le mode autosomique récessif. Cependant, dans le registre français, 9% des patients atteints de formes sporadiques de MVO présentaient aussi des mutations sur le gène *EIF2AK4*. Les formes sporadiques elles, sont généralement liées à des expositions chroniques à des solvants organiques (Trichloréthylène) mais également à des agents chimio thérapeutiques (Cyclophosphamide, Mitomycine C), mais dans ces cas-là, les mutations dans *EIF2AK4* ne sont jamais retrouvées. De manière générale, les femmes sont plus touchées que les hommes (86%) (Günther et al., 2019). Comme pour les patients HTAP, l'élévation de la PAP aboutit à une hypertrophie cardiaque droite puis une défaillance cardiaque droite et à terme au décès du patient.

2- Classification de la MVO

Initialement considérée comme une forme d'HTP distincte de l'HTAP dans la précédente classification clinique des HTP, groupe 1' (Simonneau et al., 2013), la maladie veino occlusive pulmonaire (MVO) a été intégrée dans le groupe 1 des HTAP en tant qu'HTAP avec atteinte veineuse pulmonaire prédominante (Sous-groupe 1.6 des HTAP) (Simonneau et al., 2019), considérant qu'elle faisait partie du même spectre de maladies que l'HTAP. Cependant, par commodité pour les thèmes de recherches développés dans ce mémoire, nous continuons à la traiter comme une entité à part et à la désigner sous l'étiquette « maladie veino occlusive pulmonaire » (MVO).

On distingue au sein des MVO les formes idiopathiques, héritables (mutations bi-alléliques du gène EIF2AK4), secondaires à une exposition à un toxique (chimiothérapies, solvants organiques) et les MVO associées à une connectivite, en particulier la sclérodermie (Günther et al., 2019).

3- Epidémiologie de la MVO

La maladie veino-occlusive pulmonaire est une maladie très rare, avec une incidence annuelle estimée à 0.1 à 0.2 cas par million (Günther et al., 2019). Cependant, cette estimation est probablement sous-estimée due aux fréquentes erreurs de diagnostic, la MVO étant confondue avec une HTAP sans atteinte veineuse pulmonaire prédominante. De plus, son incidence est plus élevée chez les patients présentant les facteurs de risque connus de la MVO (sclérose systémique, exposition à des solvants organiques et les traitements des cancers par des agents alkylants). En effet, l'incidence de MVO chez les patients atteints de cancer anal qui ont été exposés à la MMC est d'environ 3.9 pour 1000 (Perros et al., 2015).

4- Diagnostic de la MVO

Les patients atteints de MVO présentent des symptômes non spécifiques et communs avec les patients atteints d'HTAP sans atteinte veineuse pulmonaire prédominante (ci-après appelés patients avec HTAP par opposition aux patients souffrant de MVO) comme l'essoufflement et la fatigue à l'effort essentiellement (Mandel et al., 2000; Montani et al., 2016a). La MVO possède les mêmes caractéristiques hémodynamiques que l'HTAP sans atteinte veineuse pulmonaire prédominante ($PAPm > 20\text{mmHg}$, $RVP > 3$ unités Wood et $PAPO < 15$), et de fait le cathétérisme cardiaque droit ne permet pas de différencier les deux formes d'HTAP (Montani et al., 2016b). Le diagnostic de MVO est généralement évoqué devant la présence d'anomalies scanographiques (lignes septales, nodules flous, adénopathies médiastinales) (Figure 30), et d'une diffusion du monoxyde de carbone (DLCO = Diffusion Capacity for Carbon Monoxyde) effondrée associée à une hypoxémie profonde. (Günther et al., 2019; Montani et al., 2016b).

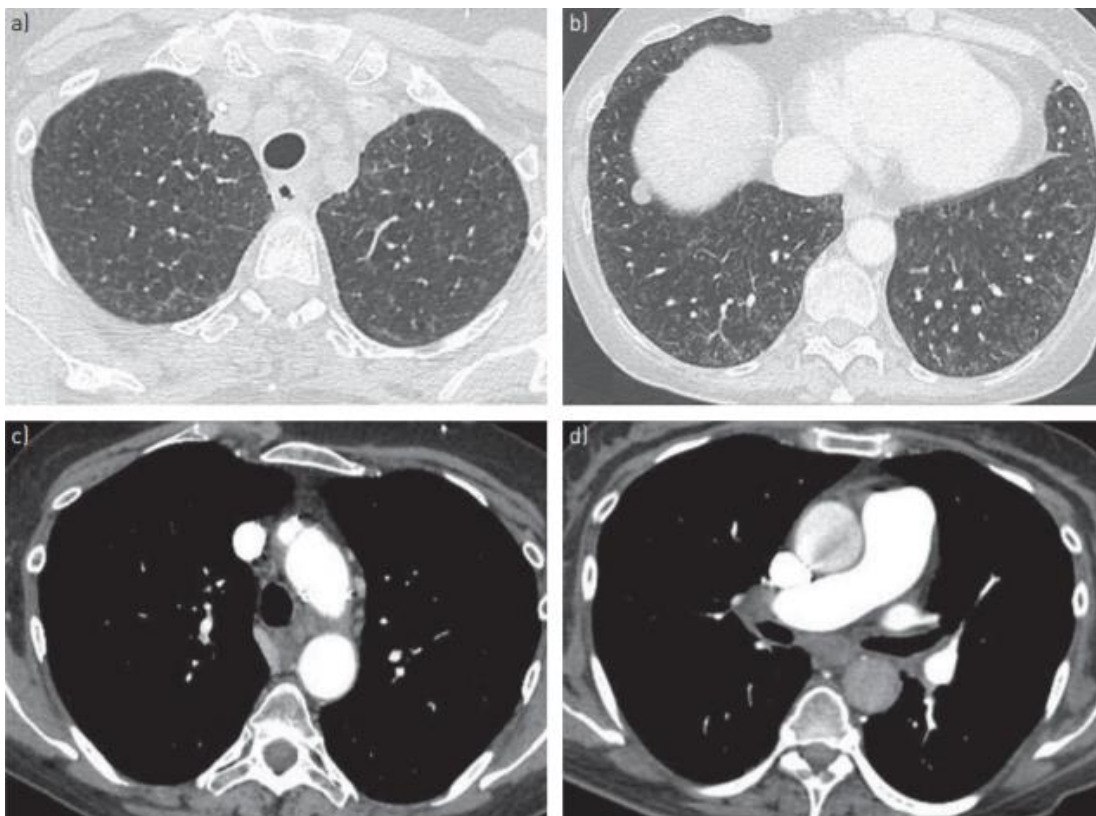


Figure 30 : Images de tomographie à haute résolution caractéristiques de la présence de maladie veino-occlusive pulmonaire. A) et B) Présence de lignes septales et opacités en verre dépoli centrolobulaires. C) et D) Elargissement de ganglions lymphatiques latéroaortiques et sous-carinaires (d'après Montani et al, 2016).

Le tableau 7 regroupe les différents paramètres clés qui permettent de différencier les patients atteints de MVO de ceux atteints d'HTAP (Tableau 7).

	PAH	PVOD
Genetics		
Main gene mutation	<i>BMPR2, ACVRL1, ENG, KCNK3, CAV-1, SMAD9</i>	<i>EIF2AK4</i>
Genetic transmission	Autosomal dominant	Autosomal recessive
Epidemiology		
Estimated prevalence	15 cases per million	1–2 cases per million
Sex ratio	Female predominance (~2:1)	No sex predominance
Smoking	Possible association	More prevalent than idiopathic PAH
Occupational exposure	Absent	Organic solvent (trichloroethylene)
Risk factors		
Drugs and toxins	Anorexigens (aminorex, fenfluramine derivatives, benfluorex), dasatanib, interferon	Chemotherapy (alkylating agents)
Associated conditions	Connective tissue disease, congenital heart disease, HIV infection, portal hypertension	Connective tissue disease particularly in systemic sclerosis
Clinical examination		
Haemoptysis	Possible	Possible
Auscultatory crackles	Absent	Rare, except in presence of pulmonary oedema
Pleural effusions	Possible	Possible
Right heart catheterisation		
mPAP, PAWP, PVR	Increased mPAP, normal PAWP, increased PVR	Increased mPAP, normal PAWP, increased PVR
Acute vasoreactivity testing	~10% in idiopathic PAH (predicts long-term CCB response)	~10% (not a predictor of CCB response)
Pulmonary function		
FEV ₁ , FVC, TLC	Normal (possible mild reduction)	Normal (possible mild reduction)
D _{LCO} , D _{LCO} /V _A	Normal or mildly reduced	Severe reduction
Resting P _{aO₂}	Normal or mildly reduced	Often severe reduction
Desaturation on exercise	Often present	Often severe reduction
Imaging		
Chest HRCT	Usually normal parenchyma	Centrilobular ground-glass opacities, septal lines, mediastinal lymph node enlargement
V/Q' lung scan	Usually normal	Usually normal
Bronchoscopy		
BAL	Normal	Possible occult alveolar haemorrhage
Treatment		
Targeted PAH therapy	RCTs demonstrating improved haemodynamics, functional capacity and clinical outcomes	Risk of pulmonary oedema Conflicting data from small case series

mPAP: mean pulmonary artery pressure; PAWP: pulmonary artery wedge pressure; PVR: pulmonary vascular resistance; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity; TLC: total lung capacity; D_{LCO}: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; D_{LCO}/V_A: D_{LCO} adjusted for alveolar volume; P_{aO₂}: arterial oxygen tension; HRCT: high-resolution computed tomography; V/Q': ventilation/perfusion; BAL: bronchoalveolar lavage; *BMPR2*: bone morphogenetic protein receptor type 2; *ACVRL1*: activin A receptor type II-like kinase 1; *ENG*: endoglin; *KCNK3*: potassium channel subfamily K member 3; *CAV-1*: caveolin 1; *EIF2AK4*: eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4; CCB: calcium channel blocker; RCT: randomised controlled trial.

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques clés permettant de distinguer les HTAP des MVO (d'après Montani et al, 2016).

CHAPITRE 8 : Génétique de la MVO

1- Le gène *EIF2AK4*

1-1 Les mutations du gène *EIF2AK4*

Les mutations dans le gène *EIF2AK4* qui code pour la protéine GCN2 (General Control Nonderepressible 2) sont les seules mutations connues dans les formes familiales de MVO. Ainsi, le registre français de l'HTP comprend 13 familles atteintes de formes héritables de MVO, qui présentent toutes des mutations bi-alléliques perte de fonction d'*EIF2AK4*. De plus, 9% des patients atteints de MVO dites sporadiques (7 sur 81) présentent également des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4*. Ces MVO héritables se transmettent sur le mode autosomique récessif. Les porteurs de la mutation sont plus jeunes au diagnostic avec une absence de facteur de risque de MVOP tels que l'exposition à des agents alkylants ou à des solvants organiques. Aujourd'hui, 24 mutations sont connues sur le gène *EIF2AK4*, certaines sont homozygotes, d'autres hétérozygotes (Eyries et al., 2014) (Figure 31).

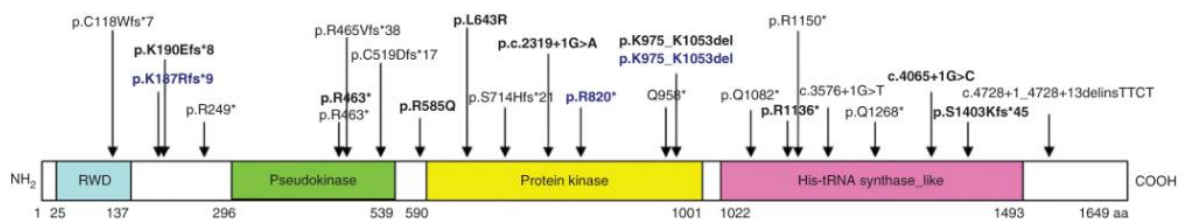


Figure 31 : Localisation et conséquences des mutations récessives sur le gène *EIF2AK4* chez les patients atteints de forme familiale de MVO (D'après Eyries et al, 2014)

1-2 GCN2 et la voie de la RIS

La voie de la RIS (Réponse Intégrée au Stress) est une voie commune à tous les eucaryotes qui permet aux cellules d'activer une réponse adaptée à divers stress afin de restaurer l'homéostasie cellulaire. Ces stress vont conduire à la phosphorylation d'eIF2 α sur la sérine 51 par l'une des 4 kinases (GCN2, PERK, PKR et HRI) de la famille d'eIF2 α . Cette activation induit une diminution globale de la traduction et une augmentation de certains gènes nécessaire à une réponse adaptée. La RIS est donc principalement une voie de survie et qui favorise l'homéostasie cellulaire lorsque la cellule est confrontée à un stress. Chacune des kinases est activée en réponse à un stress particulier et active un programme transcriptionnel propre. La kinase GCN2 est activée lors d'une carence en acide-aminé (Figure 32), la kinase PKR est

activée lors d'une infection virale, HRI est activé en cas de carence en hème et enfin PERK est activé en cas de stress du réticulum endoplasmique (ER stress) (Figure 33).

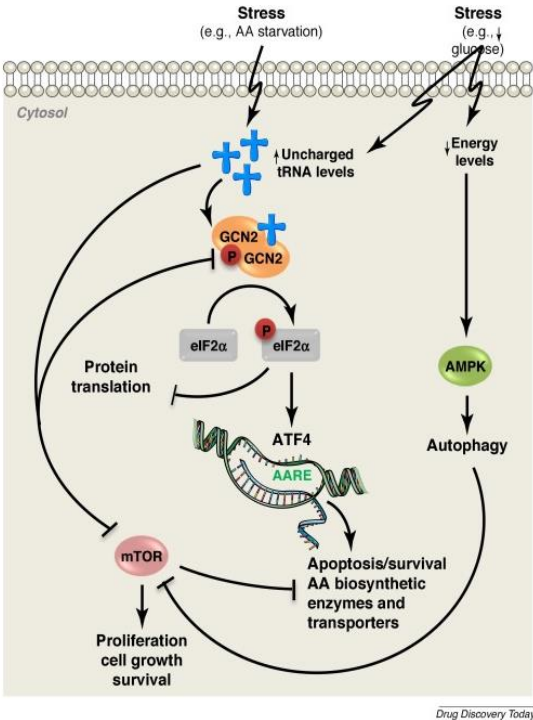


Figure 32 : Voie de signalisation activée par GCN2 lors d'une carence en acides aminés.

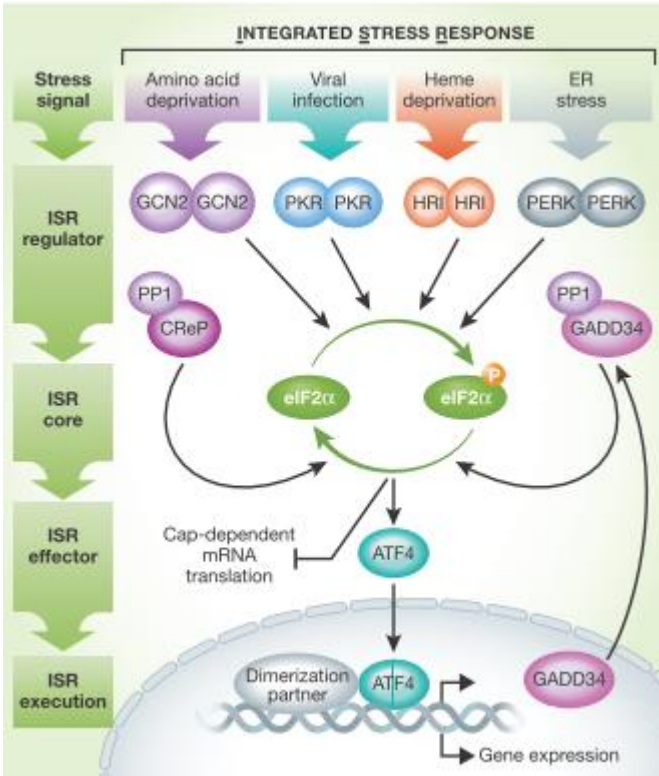


Figure 33 : Aperçu schématique de la réponse intégrée au stress (RIS).

L'unique voie de signalisation dépendante de GCN2 décrite dans la littérature est celle de la RIS qui induit une phosphorylation de eIF2 α et une expression de facteurs tels que CHOP, HO-1 et ATF4. Ces facteurs n'avaient pas été décrits auparavant comme étant impliqués dans l'homéostasie vasculaire. Cependant la perte de l'expression de cette protéine est responsable de l'apparition de la MVO.

Cependant, le rôle de GCN2 dans l'homéostasie cellulaire en acides aminés implique son homologue fonctionnel mTOR (Molecular Target of Rapamycin). En effet, ce dernier est activé lorsque la cellule possède des acides aminés en abondance et va ainsi favoriser la croissance et la prolifération tout en inhibant GCN2. Inversement, lorsque la cellule manque d'acides aminés, GCN2 est activé et l'activité de mTOR est réprimée (Figure 34).

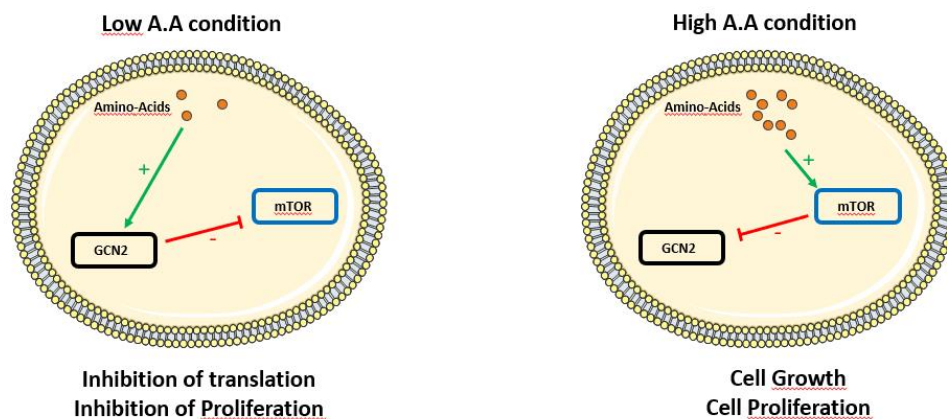


Figure 34 : Schéma de l'interaction entre mTOR et GCN2 conditionnée par la disponibilité en acides aminés dans la cellule.

Ces deux protéines étant fortement liées l'une à l'autre par leur fonction, il est possible que la perte de GCN2, qui est un frein à l'activité de mTOR soit responsable de l'hyper-prolifération des cellules vasculaires dans la MVO.

Cependant, cela n'explique pas que cette hyper-prolifération soit localisée au niveau des CE des micro-capillaires pulmonaires. Il est probable que la perte de GCN2 régule d'autres voies de signalisation propres au poumon et il est donc nécessaire de les identifier afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le développement de la maladie.

1-3 Relation structure-fonction de la protéine GCN2

La protéine GCN2 est une sérine-thréonine kinase ubiquitaire hautement conservée chez les eucaryotes sur le plan structural et fonctionnel. Elle est codée par le gène *EIF2AK4* localisé sur le chromosome IV (Castilho et al., 2014). GCN2 est composée d'un domaine RWD (RING Finger-containing proteins ; WD-repeat-containing protein ; yeast DEAD-like helicase) situé dans la partie N-terminale nécessaire à la liaison de son cofacteur GCN1 (Figure 35), un domaine pseudo-kinase sans fonction enzymatique, un domaine kinase catalytique, un domaine His/RS également sans fonction enzymatique qui lie les ARN de transfert non chargés et finalement un domaine C-terminale requis pour la dimérisation de la protéine avec le domaine de liaison du ribosome 60S (Figure 36 et 37) (Castilho et al., 2014).

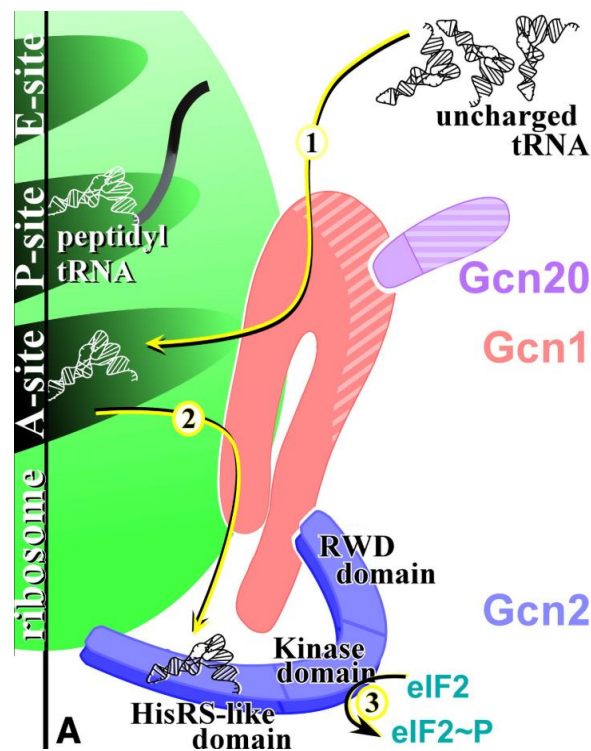


Figure 35 : Schéma de l'interaction entre GCN1 et GCN2 sur son domaine RWD (d'après Castilho et al, 2014).



Figure 36 : Schéma des domaines protéiques de la protéine GCN2.

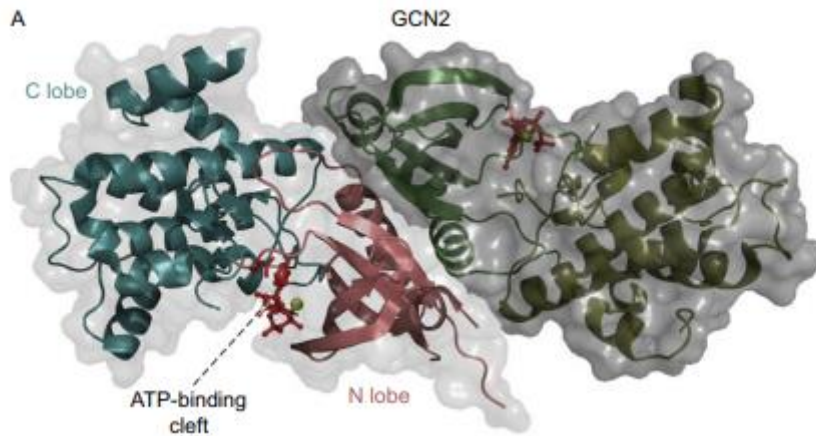


Figure 37 : Modélisation structurelle de la protéine GCN2 obtenue par cristallographie.

Cette structure, est nécessaire pour coordonner 3 processus : 1) l'initiation de la transcription des ARNm si la disponibilité en acides aminés est suffisante 2) la détection les ARNt non chargés en cas de carence de ces derniers 3) l'activation d'un programme transcriptionnel pour récupérer du manque de nutriments via l'activation de la RIS. Cette réponse requiert la phosphorylation de la sous unité alpha d'eIF2 α (eucaryotic initiation factor 2) sur la sérine 51. Cette activation induit une diminution globale de la traduction protéique tout en favorisant simultanément une traduction d'ARNm spécifique comme ATF4.

En effet lorsque le facteur Eif2 α est phosphorylé, il empêche l'échange du GDP en GTP du facteur eIF2. Cela retarde la formation de complexe ternaire ARNt-a.a + eIF2 + GTP nécessaire à la traduction des ARNm par les ribosomes. Ensuite, ATF4 augmente l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress et l'import d'acides aminés (GADD34, CHOP, ASNS, CAT1, SNAT2 ou TRB3).

CHAPITRE 10 : Physiopathologie de la MVO

La MVO est caractérisée par un remodelage des artères, des capillaires et des veinules pulmonaires (Figure 38) (Eyries et al., 2014). La MVO et l'HTAP présentent des similarités cliniques avec l'HTAP purement précapillaires (Montani et al., 2016b). Cependant, il est important de différencier ces deux conditions car les patients MVO présentent un pronostic plus sombre et ils peuvent développer des œdèmes pulmonaires lorsqu'ils sont initialement traités avec une thérapie spécifique de l'HTAP (Montani et al., 2016b). Un diagnostic fiable et précis est possible pour les patients MVO en utilisant les paramètres mesurant l'oxygène, la diffusion du monoxyde de carbone ou des signes caractéristiques en radiographie de la poitrine (Montani et al., 2016b).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie médicale pour les patients atteints de MVO et seule la transplantation pulmonaire reste l'unique et définitive option pour les patients éligibles.

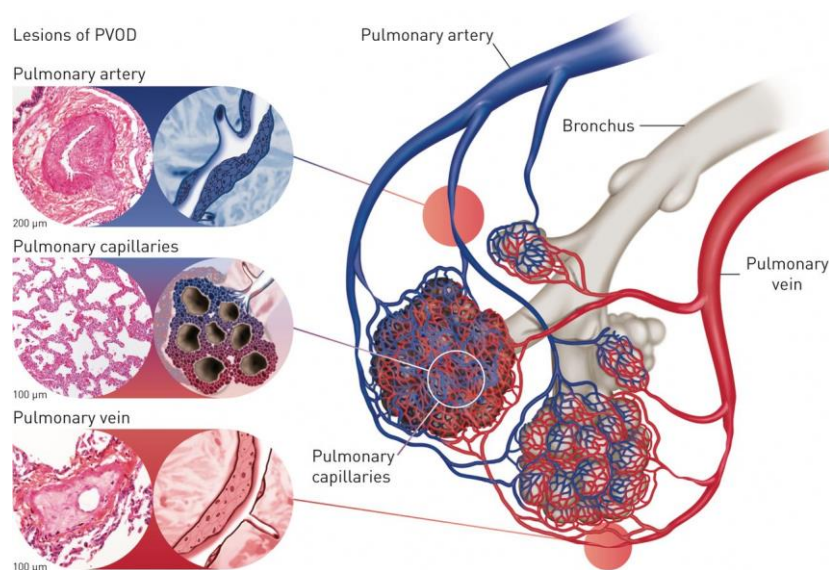


Figure 38 : Schéma des lésions vasculaires pulmonaires caractéristiques de la MVO.

1- Histologie de la MVOP

1-1 Lésions artérielles

L'HTAP est caractérisée par des lésions artérielles présentant une fibrose intimale et une hypertrophie médiale alors que dans la MVO il y a plus de fibrose intimale et une hypertrophie médiale plus légère (Nossent et al., 2018) (Figure 39). Cependant, les lésions plexiformes caractéristiques de l'HTAP sévère ne sont pas retrouvées (Montani et al., 2016b).

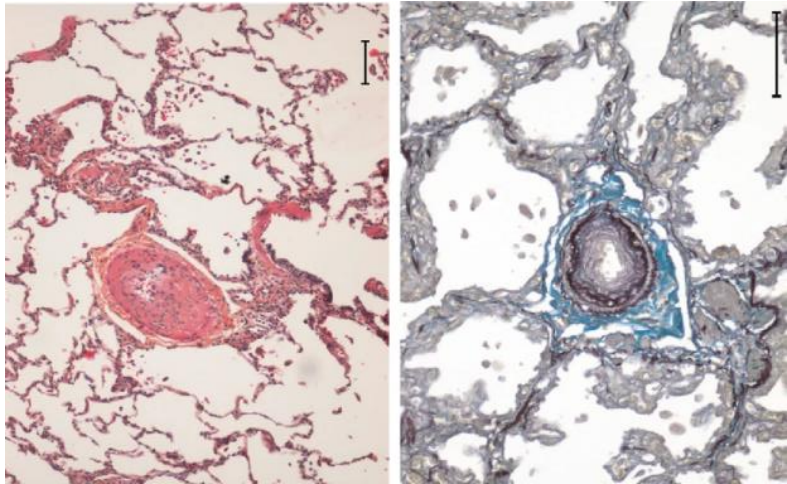


Figure 39: Lésions artérielles caractéristiques des patients MVO.
A gauche, une artère avec un remodelage de l'intima. A droite, une fibrose de l'intima d'une petite artère.

1-2 Lésions veineuses

Les lésions veineuses sont la caractéristique majeure de la MVO. En effet, les patients atteints de MVO présentent une vasculopathie importante des veinules et veines pré-septales pulmonaires (Montani et al., 2016b). Cette vasculopathie est caractérisée par une fibrose qui obstrue la lumière du vaisseau (Figure 40).

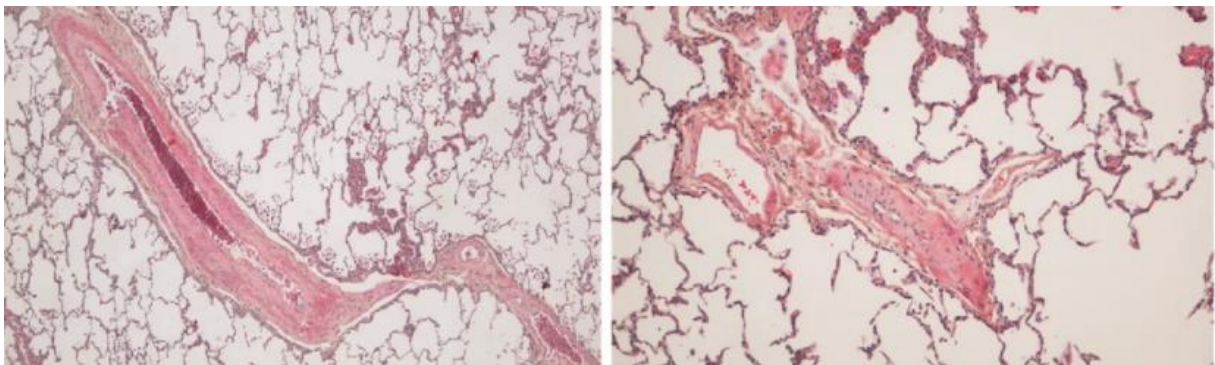


Figure 40 : Lésions veineuses caractéristiques de la MVO. A gauche, une fibrose intimale au niveau d'une veine septale. A droite, une petite veine avec une fibrose intimale occlusive.

1-3 Lésions des capillaires pulmonaires

Les capillaires pulmonaires sont également modifiés dans la MVO. En effet, ces derniers présentent une prolifération exubérante focale (appelée hémangiomatose capillaire) qui amène à un épaissement des cloisons septales (Figure 41). Cette prolifération des capillaires va perturber les échanges gazeux avec les alvéoles pulmonaires et résulter en la faible DLCO caractéristique des patients MVO (Montani et al., 2016b).

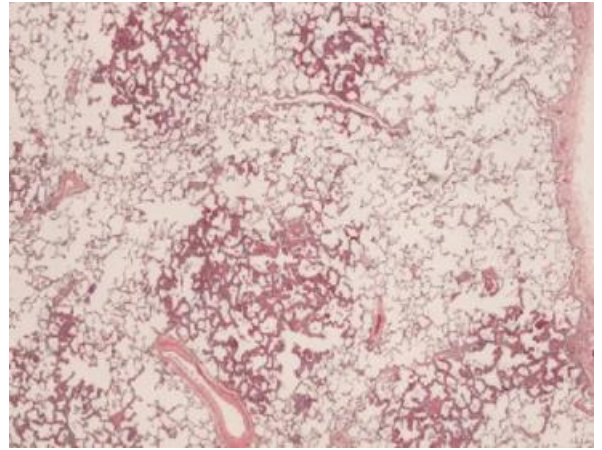


Figure 41: Foyers d'hémangiomatose capillaire pulmonaire chez un patient MVO.

2- Pathogénèse moléculaire de la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO)

Contrairement à l'HTAP, peu de choses sont connues sur les altérations moléculaires impliquées dans le développement de la MVO. Cependant, du fait des similitudes histologiques entre l'HTAP et la MVO il est probable que certaines voies de signalisation soient communes entre ces deux conditions pathologiques. En effet, l'axe du PDGF et de son récepteur PDGFR est augmenté tout comme l'hyperplasie du muscle lisse dépendant de la sérotonine (Assaad et al., 2007; Kawut et al., 2005; Perros et al., 2008).

Par ailleurs, comme dans l'HTAP, la dysfonction endothéliale est présente dans la MVO avec pour conséquence une altération de l'expression de la eNOS et donc une diminution de la production de NO par l'endothélium vasculaire pulmonaire (Kradin et al., 2005).

Par contre, contrairement à l'HTAP, les protéines PPAR- γ ou la cavéoline-1 sont conservées (Sullivan et al., 2005).

L'inflammation a d'ailleurs été proposée comme un mécanisme impliqué dans le développement de la MVO. En effet, certaines maladies inflammatoires sont associées au développement de la MVO et les cellules immunes comme les cellules cytotoxiques de type T et les cellules dites « natural killer » (NK) pourraient jouer un rôle important dans le développement des lésions vasculaires. La proportion de ces cellules chez les patients MVO est modifiée et ces cellules libèrent une grande quantité de granulysine (Perros et al., 2013).

La granulysine est connue pour être impliquée dans plusieurs maladies telles que les infections, le cancer ou l'auto-immunité.

Pour les patients présentant une mutation dans le gène *EIF2AK4*, les mécanismes moléculaires impliqués pourraient être liés à la réponse transcriptionnelle dépendante de GCN2. En effet, GCN2 étant une kinase de réponse au stress, il est possible d'imaginer que sa perte pourrait entraîner une faiblesse à divers stress cellulaires comme le stress oxydatif ou l'inflammation (Donnelly et al., 2013). En effet, les souris *Gcn2^{-/-}* exposées à l'asparaginase (chimiothérapie induisant une dégradation de l'asparagine) présentent une forte augmentation d'un stress oxydatif ainsi des dégâts à l'ADN dépendant d'un excès d'inflammation (Wilson et al., 2013). Enfin, plus récemment, Lathen et al, ont démontré que l'axe ERG-APLNJ jouait un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales pulmonaires. ERG est un facteur de transcription connu pour être un modulateur de la différenciation des cellules endothéliales (Lathen et al., 2014). Or, les patients PVOD présentent une perte de ce facteur ERG comparé aux patients contrôles. Cependant, le potentiel lien entre GCN2 et cet axe ERG-APLNJ reste à clarifier.

CHAPITRE 11 : Traitements de la MVO

1- Traitements spécifiques de la MVO

Le traitement de l'HTAP a connu des avancées considérables. En effet, les prostaglandines, les antagonistes du récepteur de l'endothéline-1, les inhibiteurs de PDE-5 ou les activateurs solubles de la guanylate cyclase ont significativement amélioré la qualité de vie des patients HTAP. Cependant, ces traitements vasodilatateurs peuvent être responsables d'œdèmes pulmonaires lorsqu'ils sont prescrits à des patients MVO (75% des cas pour les inhibiteurs calciques et 50% des cas pour les autres traitements spécifiques de l'HTAP), ce qui limite leur utilisation (Montani et al., 2016b).

Il est donc nécessaire d'obtenir des traitements spécifiques et efficaces pour les patients MVO. Cependant, le manque de connaissances sur les mécanismes moléculaires et le peu de centres médicaux spécialisés dans la MVO empêchent ces patients d'avoir un traitement médical efficace. Actuellement, seul des traitements de supports non spécifiques ont été mis en place notamment les traitements antithrombotique (héparine ou autres agents thrombolytiques) (Montani et al., 2016b). En l'absence de traitement efficace et en cas de dégradation clinique, la transplantation bi-pulmonaire reste la seule option proposée aux patients éligibles (Simonneau et al., 2019).

2- Traitements de support non spécifiques de la MVO

En l'absence de traitements spécifiques efficaces pour la MVO, il existe des traitements de support afin d'améliorer la qualité de vie du patient.

L'hypoxémie retrouvée chez ces patients peut être corrigée par une administration d'oxygène afin de prévenir une aggravation des symptômes liée à une vasoconstriction hypoxique (Montani et al., 2016b).

Les patients souffrant d'HTAP peuvent recevoir des anticoagulants afin de limiter les thromboses liées au bas débit et à la dysfonction endothéliale. Cependant, les recommandations cliniques récentes (Simonneau et al., 2013) ne recommandent pas ce type de traitement de support car les patients MVO qui présentent communément des hémorragies pulmonaires (Montani et al., 2016b).

CHAPITRE 12 : Les modèles animaux de maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO)

1- Modèles toxiques

Suite à l'identification, par notre équipe, des agents alkylants comme un facteur de risque de MVO (Ranchoux et al., 2015b), les premiers modèles animaux de MVO chimio-induites ont été développés.

En premier lieu, l'équipe a étudié les conséquences pulmonaires de l'exposition à de fortes doses de cyclophosphamide (Endoxan). Ils ont observé que cette exposition induit des HTPs chez 3 espèces animales différentes : le rat, la souris et le lapin (Ranchoux et al., 2015b). En effet les souris traitées au cyclophosphamide présentent une hypertension pulmonaire caractérisée par une augmentation significative des résistances vasculaires pulmonaires ainsi qu'une hypertrophie cardiaque droite.

Chez le rat, le traitement au cyclophosphamide induit comme chez la souris une hypertension pulmonaire, progressive et dose dépendante. Elle est caractérisée par une augmentation de la pression artérielle moyenne, une hypertrophie cardiaque droite et un remodelage distal important. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les animaux femelles développent des HTP plus importantes que les mâles.

Enfin, le lapin comme le rat développe des HTP à la suite d'un traitement au cyclophosphamide. Ces animaux présentent un important remodelage artériel et veineux ainsi qu'une forte inflammation périvasculaire.

Cependant, chez les patients qui ont développé une MVO, le cyclophosphamide était donné en combinaison à d'autres traitements. C'est pourquoi le lien de causalité est plus difficile à démontrer.

Un autre agent alkylant donné seul a été identifié comme étant responsable du développement de MVO chez 6 patients traités pour un cancer anal en France : La Mitomycine-C (Tableau 8) (Perros Frédéric et al., 2015). C'est pourquoi un autre modèle animal utilisant la Mitomycine-C a été développé afin de créer un modèle toxique de MVO proche de ce qui est retrouvé chez l'Homme.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Age at diagnosis, yr	53	47	42	51	59	54
Gender, M/F	F	M	F	F	F	F
Delay between initiation of chemotherapy and PVOD, months	5	6	4	2	4	4
Chemotherapy regimen	- Mitomycin	- Mitomycin - 5-FU	- Mitomycin - 5-FU	- Mitomycin	- Mitomycin - 5-FU	- Mitomycin - 5-FU
Number of chemotherapeutical cycles	3	2	2	4	4	2
NYHA functional class, I-IV	IV	III	III	IV	III	IV
6-MWD, m	0	332	267	0	240	0
mPAP, mmHg	41	36	39	64	46	37
PCWP, mmHg	2	2	5	15	10	6
CI, L/min/m ²	2.1	1.6	2.8	3.5	4	1.9
PVR, WU	11.2	13.6	8.2	8.2	5.5	11.3
SvO ₂ , %	49	61	54	-	48	39.5
PaO ₂ , kPa (on room air)	6.1	7.7	NA	7.1	6.6	8.2 (5l/min O ₂)
DLCO, % <i>theo</i>	-	21	30	36	51	-
BNP, ng/L (<100 ng/L)	641	951	452	1536	1048	716
Chest HRCT						
- Septal lines	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
- Ground-glass opacities	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
- Lymph-node enlargement	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
PAH therapy	ERA, PDE-5i	ERA, PDE-5i	ERA, PDE-5i	ERA	ERA, PDE-5i	ERA/ corticosteroids
Cause of death	right heart failure	fatal pneumonia	anal cancer and PH	right heart failure	alive after 3 months	alive after 4 weeks

Tableau 8: Caractéristiques cliniques des patients français traités à la mitomycine C et diagnostiqués avec une MVO.

Dans ce modèle utilisant la rate (démontrée comme étant plus sensible aux agents alkylants dans le modèle CP et MMC), une injection en IP de Mitomycine-C est réalisée à J0 et une seconde à J8 et résulte dans le développement d'une MVO visible par une augmentation de pression et un remodelage vasculaire veineux et artériel couplé à des foyers de prolifération endothéliaux importants (Perros Frédéric et al., 2015). Ce modèle présente une perte de l'expression pulmonaire de la protéine GCN2 et ce, de manière dose dépendante à la quantité de mitomycine-C injectée. Ce modèle est actuellement le seul modèle toxique à reproduire la majorité des caractéristiques histologiques connues dans la MVO.

2- Modèles génétiques

La littérature actuelle recense deux modèles génétiques de MVO :

Le premier est un modèle de souris développé par l'équipe de Lathen et al. Cette équipe a généré des souris KO endothélial-spécifique pour ERG et APLNR. Dans ce modèle les mutants présentent une forte prolifération endothéliale in vitro et avec des veinules post-capillaires remodelées (Lathen et al., 2014). Cependant, ces souris *Erg*^{-/-} et *Aplnr*^{-/-} ne présentent pas de diminution de l'expression de GCN2 ce qui suggère que le mécanisme impliqué dans le remodelage veineux dans ces modèles animaux est indépendant de GCN2. Par ailleurs, ce

modèle ne reproduit que les lésions veineuses, mais pas l'ensemble des lésions vasculaires retrouvées chez les patients MVO.

Le second modèle est un modèle de rat récemment développé par Florent Soubrier et son équipe. Ces animaux possèdent des mutations bi alléliques de *Eif2ak4*.

Des résultats préliminaires montrent que ces animaux ne développent pas d'HTP spontanément. Cependant, les mesures échocardiographiques mettent en évidence une diminution significative du PAAT (Pulmonary Arterial Acceleration Time), un indice de l'augmentation de la poste-charge du VD, chez les animaux mutés.

Par ailleurs, lorsque ces animaux sont traités à l'asparaginase, les rats porteurs de la mutation meurent quelques jours après le début du traitement alors que les animaux sauvages ne sont pas affectés.

Matériels et Méthodes

1- Caractérisation d'un modèle de MVO chimioinduite chez la rate

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats femelles âgées de 4 semaines avec un poids d'environ 100g provenant de l'élevage Janvier Labs.

2- Echocardiographie cardiaque

Les rates sont d'abord pesées puis anesthésiées à l'isoflurane dans une cage d'induction (2L/min, 3% d'isoflurane dans l'air, Minerve, Esternay, France) et maintenues avec un flux de 1L/min à 1.5-2.5% d'isoflurane au masque. L'analyse échocardiographique (Vivid E9, GE Healthcare) des animaux a permis de recueillir les paramètres suivants :

- Heart Rate (HR) = Fréquence cardiaque
- Pulmonary Artery Acceleration Time (PAAT) qui est un reflet des résistances vasculaires pulmonaires.
- Velocity Time Integral (VTi) qui est le reflet du flux sanguin.
- RV & LV Thickness qui correspondent à l'épaisseur du ventricule droit et gauche respectivement. Ces paramètres estiment de possibles hypertrophies ventriculaires droites et/ou gauches.
- RV End Diastolic Diameter (RVEDD) et LV End Diastolic Diameter (LVEDD) qui correspondent respectivement au diamètre du ventricule droit et gauche lors de la diastole. Ces paramètres estiment de possibles dilatations ventriculaires droites et/ou gauches.
- RV End Systolic Diameter (RVESD) et LV End Systolic Diameter (LVESD). Ces paramètres estiment le diamètre du ventricule droit et gauche lors de la systole
- RV Fractional Shortening (RV FS) et LV Fractional Shortening (LV FS). Il peut être calculé avec la formule ci-dessous

$$LV FS(\%) = \left(\frac{LVEDD - LVESD}{LVEDD} \right) * 100 \text{ ou } RV FS(\%) = \left(\frac{RVEDD - RVESD}{RVEDD} \right) * 100$$

Ces paramètres estiment le pourcentage de modification du diamètre du VD ou du VG, entre la diastole et la systole.

- Cardiac Output Index (CO) = Débit cardiaque, calculé avec la formule ci-dessous :

$$CO = \frac{\text{valve area (cm}^2\text{)} * VTi * HR}{\text{Animal weight (g)}}$$

3- Mesures hémodynamiques par cathétérisme cardiaque droit

Les animaux sont endormis à l'aide d'un mélange air + Isoflurane (5% pour l'initiation et 3% pour le maintien). Dans un premier temps, l'artère carotide gauche et la veine jugulaire droite sont dégagées. Une sonde thermique est insérée dans la carotide et un cathéter ombilical courbé relié à un capteur de pression est inséré dans la jugulaire jusqu'à atteindre l'oreillette droite puis le ventricule droit. Ce cathéter permet de mesurer la pression ventriculaire droite systolique (PVDs). Le débit cardiaque est mesuré par thermodilution avec une solution de NaCl 0,9 % injectée dans la jugulaire. La sonde thermique présente dans la carotide va mesurer les variations de température, qui seront le reflet du débit cardiaque. En effet, plus le débit cardiaque est faible plus la variation de température mesurée est lente. A l'inverse, plus le débit cardiaque est important, plus la variation de température détectée par la sonde est rapide.

4- Prélèvement des poumons de rats

Une fois les mesures échocardiographiques et/ou hémodynamiques réalisées, les animaux sous anesthésie profonde sont euthanasiés par exsanguination via l'aorte abdominale. Cette technique de mise à mort permet d'obtenir des poumons présentant des vaisseaux dépourvus de sang pour une analyse optimale en histologie.

Pour prélever les poumons, la cage thoracique de l'animal est ouverte par sternotomie donnant accès au bloc cœur poumons. Le cœur est d'abord coupé au niveau de l'aorte et de l'artère pulmonaire et mis dans du sérum physiologique pour ensuite mesurer l'hypertrophie cardiaque droite.

Le poumon gauche, ligaturé au niveau du hile, est coupé en aval de cette ligature et congelé à sec directement dans l'azote pour effectuer par la suite une étude de l'expression génique et protéique.

Une canule est ensuite introduite dans la trachée pour gonfler les poumons dans état proche de l'inspiration physiologique avec de l'OCT (Optimal Cutting Temperature) dilué au ½ avec du sérum physiologique. Un lobe est séparé et mis dans le formol et sera inclus en paraffine pour effectuer une analyse histologique. Le reste du poumon gonflé est directement congelé dans

l'isopentane refroidi par de la carboglace. Ce poumon congelé permet de faire des cryo-coups pulmonaires destinées à des marquages en immunofluorescence.

5- Mesure de l'hypertrophie cardiaque droite

Le ventricule droit est séparé du ventricule gauche + septum. Les deux parties sont pesées pour mesurer l'indice de Fulton qui caractérise l'hypertrophie cardiaque droite grâce à la formule suivante :

$$\text{Indice de Fulton} = \frac{\text{Poids du ventricule droit}}{\text{Poids du ventricule gauche} + \text{Septum}}$$

La valeur de référence de cet indice pour un cœur sain est de 0.25. La valeur de cet indice augmente avec l'hypertrophie du ventricule dans le cas où il n'y a pas d'hypertrophie du ventricule gauche concomitante.

6- Patients

Les patients atteints d'HTAP idiopathique ou héritable avec une identification d'une mutation sur le gène *BMPR2*, les patients atteints de forme héritable de MVOP avec une mutation sur le gène *EIF2AK4* ainsi que les porteurs sains de mutation *BMPR2* et les patients contrôles ont été utilisés dans l'étude de la méthylation du génome.

Les prélèvements sanguins sont réalisés durant les visites de suivis.

Les patients malades et les contrôles proviennent des Hôpitaux du Kremlin Bicêtre et du Centre Chirurgical Marie Lannelongue.

Avant chaque prélèvement un consentement libre et éclairé est obtenu pour chaque patient malade et contrôle.

7- Prélèvements

Pour chaque patient atteint d'HTAP et sujets contrôles, environ 10 ml de sang sont prélevés dans des tubes EDTA pour l'isolation des lymphocytes T CD4⁺ circulants dans l'étude de la méthylation du génome des patients atteints d'HTAP et de MVOP.

Les échantillons pulmonaires ont été prélevés à la suite d'une transplantation pulmonaire des patients malades et une lobectomie est réalisée pour les patients contrôles (éloignée du foyer cancéreux).

8- Isolement des Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ sont isolés à partir du sang frais des patients malades et de sujets contrôles. L'isolement cellulaire des lymphocytes CD4⁺ est réalisé rapidement en une seule étape à partir de sang total, maximisant la récupération et la viabilité des cellules purifiées en utilisant le *RosetteSep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail* (StemCell technologies™). Ce kit est dédié à l'isolation des lymphocytes T CD4⁺ à partir du sang total par sélection négative. Les cellules non désirées sont capturées par un complexe tétramérique d'anticorps reconnaissant CD8, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCRγ/δ et la glycophorine A exprimée par les globules rouges (GRs). Après centrifugation sur un gradient de densité (*RosetteSep™ DM-L*, StemCell technologies™), les cellules non voulues sont culotées avec les GRs. Les lymphocytes T CD4⁺ sont alors présents à l'interface entre le plasma et le gradient de densité. L'anneau cellulaire contenant les LTCD4⁺ est récupéré puis lavé 2 fois dans du PBS + SVF 2% après centrifugation à 400g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire une fois isolé est congelé à -80° pour la création de la bio-banque de LTCD4⁺.

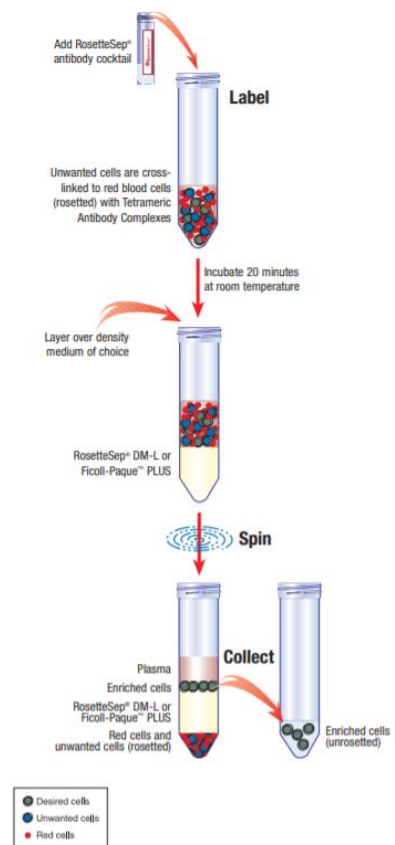


Figure 42 : Schéma des étapes d'isolation de LTCD4⁺ par le kit RosetteSep Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail.

9- Isolement des cellules endothéliales pulmonaires humaines

L'isolement des cellules endothéliales (CEs) s'effectue en deux étapes successives : Une dissociation enzymatique et une sélection spécifique par un anticorps anti-CD31 couplé à des billes ferromagnétiques.

Tout d'abord, la plèvre est retirée du parenchyme pulmonaire puis ce dernier est digéré avec une solution enzymatique contenant de la Dispase (1,7 U/mg). La suspension est incubée sous agitation à 37°C pendant 2h avant d'être filtrée à l'aide d'un Cell Strainer (tamis cellulaire de 70µm) et lavé dans un mélange HBSS + SVF 10%. Les cellules isolées sont ensuite ensemencées sur des plaques 6 puits recouverts de gélatine 0.1% à 37°C.

Durant la phase de culture, les globules rouges et les cellules non adhérentes sont régulièrement retirées afin d'optimiser la croissance des cellules endothéliales.

Lorsque les cellules arrivent à 80% de confluence, les CEs sont décollées à la trypsine (TrypLE Express 1X, Life Technologies™) et incubées avec un anticorps anti-CD31 couplé à des billes ferromagnétiques (Dynabeads CD31 Endothelial Cell, Invitrogen™) pendant 20 minutes à 4°C. Les couples billes-cellules CD31 positives (CD31⁺) sont ensuite isolés du reste de la suspension cellulaire grâce à un aimant. Les cellules CD31⁺ sont mises en culture et une fois amplifiées sont congelées dans un milieu de cryoconservation (Hyclone 2X, Life Technologies™) pour garantir leur viabilité après décongélation et réensemencement de la culture.

Etudes cellulaires et moléculaires

1- Etude de l'expression génique

1-1 Extraction des ARNs

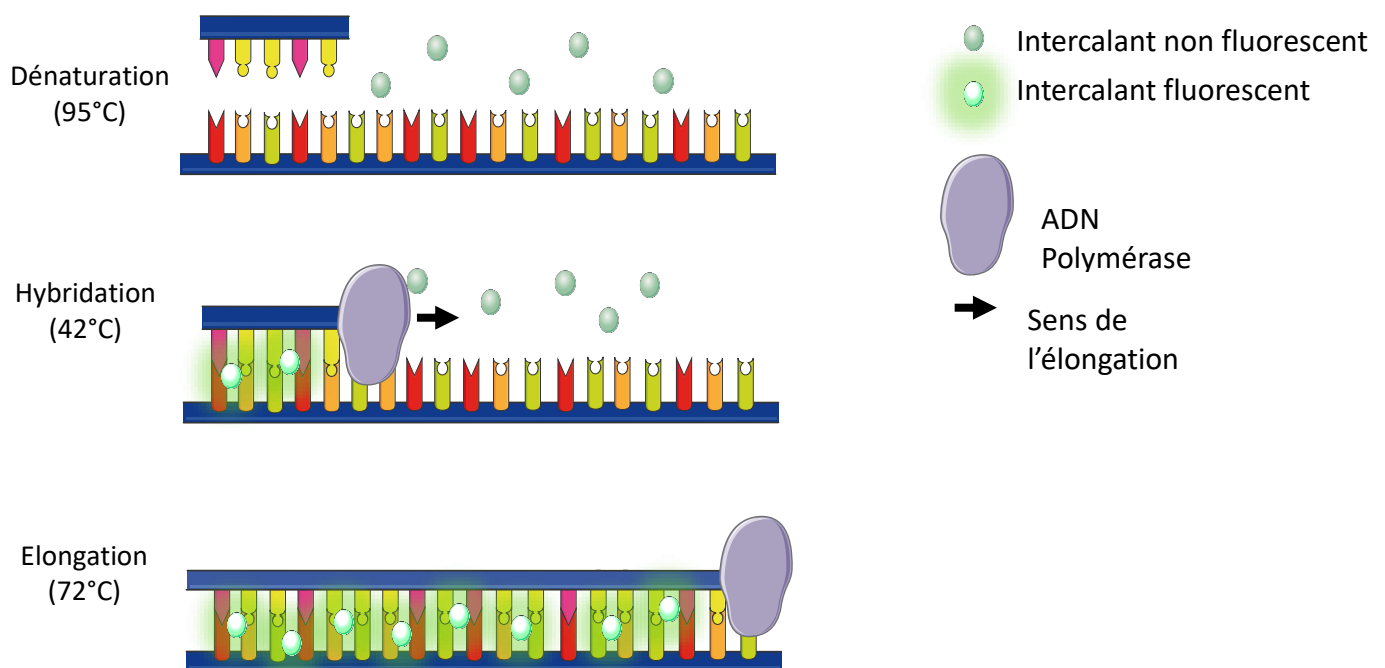
L'extraction des ARN totaux s'effectue à partir des poumons congelés ainsi que des cellules endothéliales en culture par la méthode phénol/chloroforme. Les cellules/culots cellulaires sont mis en solution dans 1ml de Trizol, puis 200 µl de chloroforme est ajouté ce qui permet la séparation des ARNs (phase aqueuse) des protéines (phase organique).

Après isolement de la phase aqueuse, les ARN sont précipités via l'ajout de 500 µl d'isopropanol puis centrifugés à 12000 rotations par minutes (RPM) pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN obtenu est lavé avec de l'éthanol 75% à 4°C. Ce dernier est ensuite séché puis re-suspendu dans de l'eau RNase free et quantifié par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide du NanodropD30 (Eppendorf™). Une lecture à 280 nm et 230 nm permettent d'estimer respectivement la contamination par des protéines et les phénols. Les ARN présentant un ratio A_{260}/A_{280} compris entre 1.80 et 2.0 et un ratio A_{260}/A_{230} compris entre 2.0 et 2.2 sont utilisés.

1-2 Transcription Inverse

La synthèse d'ADN complémentaire (ADN_c) à partir des ARN messagers est réalisée grâce au Kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen™, les Ulis, France). Cette transcription inverse s'effectue en 2 étapes.

La première étape consiste à l'élimination de l'ADN génomique (ADN_g) grâce à un tampon contenant de la DNase. La seconde étape consiste à synthétiser de l'ADN_c à partir des brins d'ARN. Cela passe par l'incubation des ARN avec une transcriptase inverse, un mélange d'amorces aléatoires et des polydT. La réaction de transcription inverse est réalisée à 42°C pendant 15 minutes. Cette température d'incubation permet une hybridation optimale des amorces sur les ARN et la copie en ADN_c de ces derniers par la transcriptase inverse. La réaction est stoppée par une incubation à 95°C pendant 3 minutes pour inactiver l'enzyme.



L'ADN_c obtenue est ensuite stocké à -20°C jusqu'à son utilisation.

Figure 43 : Schéma de la méthode de PCR quantitative par Sybr Green.

1-3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) par la technologie SybrGreen

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique d'amplification de l'ADN permettant d'obtenir un nombre abondant de copies d'une séquence d'ADN d'intérêt.

Un cycle d'amplification est composé de 3 étapes : une première dénaturation de l'ADN qui sépare les doubles brins en simple brin, s'en suit une hybridation des amorces et enfin l'élongation par une ADN polymérase qui va copier la séquence d'ADN et reformer un fragment double brin. Ce cycle est répété pour obtenir une multiplication exponentielle du fragment d'ADN ciblé. La technologie SybrGreen repose sur la propriété de ce dernier de s'intercaler entre 2 brins d'ADN et d'émettre une fluorescence. De ce fait, la quantité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente (Figure 43).

1-4 qPCR Array

Afin d'étudier un panel important de gènes de manière simultanée, la technologie des qPCR Array (Anygenes) a été utilisée dans cette étude. Cette technique permet d'analyser l'expression de 84 gènes d'intérêt spécifique à une voie de signalisation cellulaire avec 8 gènes de références différents nécessaires à la normalisation des résultats ainsi que 4 contrôles qualité.

Les qPCR Array suivants ont été utilisés :

- Voie de signalisation de la RIS chez l'humain (Anygenes) (Tableau 9).
- Voie de signalisation du BMP chez l'humain (Anygenes) (Tableau 10).

Integrated Stress Response SignArrays® Ref : ISR1H1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SLC1A4	SLC35A4	SLC3A2	SLC7A11	SLC7A5	NARS	APAF1	BBC3	BCL2	BIRC2	BIRC3	BIRC5
B	BIRC7	FOS	NAIP	NUPR1	PMAIP1	SIAH1	SIAH2	TNFRSF10B	XIAP	ATG10	ATG12	ATG16L1
C	ATG3	ATG5	ATG7	GABARAP	GABARAPL2	NBR1	SQSTM1	ASNS	ATF4	BECN1	EIF2AK2	EIF2AK3
D	EIF2AK4	EIF2S1	GCN1	MAP1LC3A	SLC38A2	DDB1	DDB2	DDIT4	ATF6	HSPA5	NFE2L2	PIK3CA
E	AKT1	IBTK	MTOR	ACTG1	EIF2AK1	EIF2B1	EIF2S3	PPP1CA	RPL7	SESN2	WARS	BCL2L11
F	CEBPB	DDIT3	ERN1	ERO1A	PPP1R15A	PPP1R15B	TRIB3	XBP1	ERCC1	ERCC2	ERCC3	GADD45A
G	BNIP3L	ATF3	ATF5	CBX4	CEBPG	EGLN2	EGLN3	LMO4	NFKB1	TFE3	TFEB	TXNIP
H	PPIA	ACTB	TBP	B2M	RPLP0	HPRT1	TFRC	GUS	POS CONT	POS CONT	NEG CONT	NEG CONT

		Amino acid transport										Protein phosphorylation
		Aminoacylation										Protein transport
		Apoptotic process										Regulation of translation
		Autophagy										Response to endoplasmic reticulum stress
		Cellular amino acid metabolic process										Response to stress
		Cellular response to amino acid starvation										Signal transduction
		DNA damage response										Transcription regulation
		Endoplasmic reticulum unfolded protein response										Reference genes
												Quality Controls

Tableau 9 : Plan de plaque de la qPCR Array regroupant les gènes impliqués dans la voie de la RIS chez l'Homme.

Personalized SignArrays (BMP Signaling)						SignArrays® Ref : PZ36A1H1						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ACVRL1	ACVR1B	ACVR1C	ACVR2A	ACVR2B	FST	SMAD3	TGFBR1	PKIA	FSTL1	OAZ1	ACVR1
B	RUNX2	SMAD9	TMEM100	GRB2	JUN	MAP2K1	MAP2K2	MAP3K7	MAPK1	MAPK14	MAPK3	MAPK8
C	RAF1	SOS1	TAB1	CAV1	CHRD	CHRD1	FSTL3	GREM1	HIPK2	LRP2	NBL1	NOG
D	SKI	SMAD6	SMAD7	SMURF1	SMURF2	SOSTDC1	TOB1	EIF4EBP1	EIF4EBP2	EIF4EBP3	ENG	FBXL15
E	FOXD1	HES5	NOTCH1	NUMA1	SMAD2	SMAD4	SOX11	UBE2O	ZNF423	AMH	NFKB1	UBE2D1
F	UBE2D3	FAM83G	GREM2	ITGA3	SFRP4	SLC39A5	TFAP2B	XIAP	LIMK1	SLC33A1	SMAD1	SMAD5
G	STAT3	ATF2	CAMK4	CREB1	CREBBP	HOXC9	MAGED1	NKX2-5	PITX2	SCX	TLX2	TOB2
H	AMHR2	FOXH1	USP15	USP9X	USP9Y	PPIA	ACTB	TBP	B2M	RPLP0	HPRT1	TFRC

Legend :

	Activin receptor signaling pathway	Positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity
	cAMP-mediated signaling	Protein ubiquitination
	Cellular protein metabolism	Regulation of BMP signaling pathway
	Cellular response to BMP stimulus	Signal transduction
	MAPK Signaling	Transcription
	Negative regulation of BMP signaling pathway	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway
	Negative regulation of translational initiation	House-Keeping Genes
	Positive regulation of BMP signaling pathway	

Tableau 10 : Plan de plaque de la qPCR Array regroupant les gènes impliqués dans la voie du BMP chez l'Homme.

2- Etude de l'expression protéique

La technique du Western Blot est utilisée afin d'évaluer l'expression des protéines d'intérêts. Les protéines sont extraites à partir de poumons congelés. Sur glace, le poumon est broyé à l'aide du gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotechnologies™) et mis en suspension dans un tampon d'extraction protéique contenant 1% d'Igepal, 20 mM de Tris HCl, 137 mM de NaCl, 10% de glycérol, 2 nM d'EDTA, 1 mM de Na₃VO₄, leupeptine à 10 µg/µl, aprotinine 10 µg/µl, des inhibiteurs de protéases (Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche™) et des inhibiteurs de phosphatase (PhosSTOP, Roche™). Pour la culture cellulaire, les cellules sont d'abord lavées dans du PBS 1X, puis grattées à l'aide d'un « Cell Scrapper » en présence du même tampon d'extraction protéique. Le lysat protéique est récupéré puis mis en agitation 1h à 4°C. Le lysat est ensuite soniqué (130W, 20kHz ; Sonics Vibra Cell™) sur glace 5s afin de casser les membranes cellulaires encore intactes puis centrifugé à 12000 RPM pendant 15 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les protéines sont dosées par la méthode colorimétrique BCA (Bicinchoninic acid Assay, Interchim™). Les protéines sont ensuite dénaturées avec ajout d'une solution volume à volume contenant du β-mercaptoéthanol + Bleu de Laemmli 2X (50 µl + 950 µl respectivement) et chauffées à 95°C pendant 3 minutes. Ce mélange peut être conservé à -20°C.

Par la suite 40 à 80 µg de protéines sont déposés sur gel de polyacrylamide (Bio-Rad™) présentant un gradient de concentration croissant de 4 à 12%. L'électrophorèse est effectuée à voltage constant (200V) pendant 35 minutes dans du tampon de migration (Pour 1L = 100 ml TrisGlycine 10X + 10 ml SDS 10% + 890 ml H₂O milliQ). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE HealthCare™) à voltage constant (100V) pendant une heure à 4°C dans du tampon de transfert (Pour 1L = 100 mL Tris Glycine 10X + 200 mL éthanol 100% + 700 mL H₂O milliQ).

Le blocage des sites non spécifiques se fait par saturation de la membrane au Polyvinyl alcohol (PVA) 1X (Sigma Aldrich™) pendant 3 minutes à température ambiante. Le PVA fait partie de la classe des bloqueurs non protéiques. Cette molécule se fixe aux parties hydrophobes de la membrane et les rend hydrophiles et insensibles aux liaisons.

La protéine d'intérêt est détectée à l'aide d'un anticorps primaire (dilué dans une solution de TBS-T 1X + BSA/Lait 5%), incubé toute la nuit à 4°C.

Dans cette étude les anticorps primaires utilisés sont récapitulés dans le Tableau 11

Target	Host specie	Clone	Supplier	Reference	Concentration
GCN2	Rabbit	-	Cell Signaling	3302	1/1000
p-GCN2 (T899)	Rabbit	EPR2320Y	Abcam	ab75836	1/1000
ATF4	Rabbit	QC0913	Sigma-Aldrich	SAB2108090	1/1000
CHOP	Mouse	L63F7	Cell Signaling	2895	1/1000
p-eiF2 α (Ser51)	Rabbit	-	Cell Signaling	9721	1/1000
BMPRII	Mouse	3F6	ThermoScientific	MA5-15827	1/1000
p-SMAD 1 (Ser463/465)/5 (Ser463/465)/8 (Ser465/467)	Rabbit	D5B10	Cell Signaling	13820	1/1000
SMAD 1/5/8	Rabbit	-	Abcam	ab80255	1/1000
p-SMAD2 (Ser465/467) /3 (Ser423/425)	Rabbit	D27F4	Cell Signaling	8828	1/1000
SMAD 2/3	Rabbit	-	Cell Signalling	3102	1/1000
TWIST1	Mouse	12A3	Santa Cruz Biotechnology	sc-81417	1/1000
p120-Catenin / Delta 1 Catenin	Mouse	6H11	Abcam	ab11508	1/10000
Cleaved Caspase 3	Rabbit	5A1E	Cell Signaling	9604	1/1000
CD45	Mouse	69/CD45	BD Transduction Laboratories	610266	1/1000
p-P38 (Thr180/Tyr182)	Rabbit	-	Cell Signaling	9211	1/1000
p-ERK1(Thr202)/2 (Thr204)	Rabbit	-	Cell Signaling	9101	1/1000
PCNA	Mouse	PC10	Dako	M0879	1/500
β -Actin	Mouse	AC-74	Sigma-Aldrich	A5316	1/10000
GCN1	Rabbit	-	Abcam	ab86139	1/5000
PERK	Rabbit	C33E10	Cell Signaling	3192	1/1000
p-PERK (Ser713)	Rabbit	Poly6494	BioLegend	649401	1/1000
PKR	Rabbit	-	Abcam	ab187883	1/1000
HO-1	Rabbit	-	Abcam	ab13243	1/2000
Survivin	Rabbit	71G4B7	Cell Signaling	2808	1/1000
ERG	Rabbit	EPR3864	Abcam	ab92513	1/1000
p-mTOR (Ser2448)	Rabbit	D9C2	Cell Signaling	5536	1/1000
mTOR	Rabbit	-	Cell Signaling	2972	1/1000
CD31	Rabbit	EP78	Sigma-Aldrich	131R-2	1/200
Ki67	Rabbit	SP6	Sigma-Aldrich	SAB5500134	1/200
p-cofilin (S3)	Mouse		Abcam		1/1000
Cofilin	Rabbit		Abcam		1/1000

Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois avec une solution de TBS-T 1X pendant 10 minutes

Tableau 11 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les expériences de Western Blot.

puis incubée avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP) pendant 1h à température ambiante. Après à nouveau 3 lavages de 10 minutes chacun, la révélation est mesurée par chimioluminescence par ajout du réactif de révélation ECL (GE HealthCare™) sur

la membrane pendant 1 minute. La réaction entre la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire et le réactif génère une luminescence mesurable avec le transilluminateur Chemi-Doc (Bio-Rad™). Le poids moléculaire des protéines révélées est repéré grâce au marqueur de taille déposé lors de la migration sur gel de polyacrylamide. L'intensité de la bande révélée est proportionnelle à la quantité de protéine. Pour chaque membrane, la protéine β -actine est utilisée comme contrôle qualité de charge de protéines. L'intensité des bandes mesurées est donc normalisée par rapport à l'intensité de l'actine du puit correspondant.

3- Etude des canaux potassiques par patch clamp

La mesure des courants potassiques par la technique de patch-clamp a été entièrement réalisée par le docteur Fabrice Antigny. L'utilisation de la configuration cellule-entière a permis de mesurer les courants K⁺ globaux ainsi que le courant spécifique de KCNK3 dans les CML fraîchement isolées de rat contrôles ou exposés à la MMC. Les potentiels de membrane au repos ont été évalués par le mode current clamp ($I=0$). Les méthodes sont décrites dans l'article « **Comparaison between human and experimental veino-occlusive disease** ».

Exposé des travaux

Durant ma thèse, mon projet principal a été de caractériser les mécanismes physiopathologiques du modèle de MVO de rate injectée à la Mitomycine C et d'identifier les similitudes physiopathologiques entre ce modèle et la maladie humaine.

Projet 1 :

Caractérisation du modèle de rat injecté à la Mitomycine C : Comparaison du modèle expérimental et de la MVO humaine

Manaud G, Nossent EJ, Lambert M, Ghigna MR, Vinhas M, Ranchoux B, Dumas SJ, Courboulain A, Girerd B, Soubrier F, Bignard J, Claude O, Lecerf F, Hautefort A, Florio M, Sun B, Nadaud S, Verleden SE, Anegon I, Rémy S, Bogaard HJ, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Grünberg K, Humbert M, Montani D, Dorfmueller P, Antigny F, Perros F

1- Rationnel

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVO) est une forme rare d'hypertension pulmonaire avec un pronostic sombre caractérisée par une prolifération fibreuse intimale généralisée, une hyperplasie musculaire des veines septales et des veinules pré-septales ainsi qu'une congestion des capillaires pulmonaires avec une prolifération similaire à l'hémangiomatose capillaire (Montani et al., 2016a). Cette maladie ne possède de traitements spécifiques efficaces et ne répond pas aux traitements actuels présents sur le marché pour l'HTAP et aujourd'hui, seule la transplantation est une alternative viable pour ces patients (Montani et al., 2016a).

La physiopathologie de la MVO est très peu explorée du aux manques de connaissances et de modèles animaux mimant la maladie. Cependant, les mutations bi-alléliques dans le gène *EIF2AK4* sont responsables de forme héritable de MVO (Eyries et al., 2014). Par ailleurs, des formes sporadiques sont également décrites, la plupart du temps lors d'une exposition chronique à des solvants organiques ou des traitements chimio thérapeutiques spécifiques (Ranchoux et al., 2015b).

C'est pourquoi nous avons développé un modèle toxique de MVO induit par exposition à la Mitomycine-C (Perros et al., 2015). Ce modèle présente des caractéristiques histologiques similaires à la MVO humaine et présente également une perte de l'expression pulmonaire de GCN2, ce qui est pertinent par rapport aux formes héritable de la maladie mutées sur le gène *EIF2AK4* mais aussi sporadiques (Perros et al., 2015).

GCN2 appartient à une famille de 4 kinases qui ont pour rôle de phosphoryler la sous-unité α de eIF2 (eIF2 α). Ces 4 sérines-thréonines kinases (GCN2, PKR, PERK et HRI) sont impliquées dans le contrôle de la traduction en réponse à différents stress. La phosphorylation de eIF2 α par une de ces kinases protège les cellules en réduisant la synthèse de protéine et en régulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress défini par le terme « Réponse Intégrée au Stress » (RIS) (Castilho et al., 2014). Ces gènes sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires importants tels que la résistance au stress oxydatif, à l'inflammation, la survie cellulaire, l'autophagie ou encore l'angiogenèse (Castilho et al., 2014). Cependant, le rôle de GCN2 et de la RIS dans le remodelage vasculaire pulmonaire dans la MVO reste à élucider.

2- Objectif de l'étude

Le laboratoire a précédemment montré que l'exposition à la Mitomycine C (MMC) est responsable de cas de MVO chimio-induites chez l'homme, et a développé un protocole permettant de mimer cette MVO induite par la MMC chez le rat (MMC-MVO). Dans cette étude, nous avons comparé la physiopathologie des formes héréditaires et sporadiques de MVOP chez l'homme et de la MMC-MVO chez le rat dans le but de mieux comprendre la maladie au niveau histologique, cellulaire et moléculaire au cours de la progression de la maladie. Cette comparaison devait permettre de découvrir des voies de signalisation communes et ainsi de trouver des nouvelles cibles thérapeutiques.

3- Méthodes

Nous avons utilisé des rates Wistar de 100g injecté avec de la MMC (3mg/kg) en IP avec une injection par semaine pendant les 2 premières semaines.

L'évaluation de l'hypertrophie cardiaque droite représentative de la présence d'une hypertension pulmonaire est réalisée à l'aide de la mesure de l'index de Fulton (VD/VG+S). De plus, une analyse écho-cardiographique est réalisée sur ces animaux afin d'évaluer la fonction cardiaque via les paramètres suivants : PAAT, Débit Cardiaque Aortique, Fraction de raccourcissement du ventricule gauche/droit, Diamètre du ventricule gauche/droit en fin de systole/diastole et l'IVDS.

Dans cette étude nous avons tout d'abord évalué les différences histologiques du remodelage vasculaire pulmonaire (artériel et veineux) du modèle de rat injecté à la MMC via des marquages hématoxyline-éosine-safran (HES) ainsi que par un marquage de Trichrome. De plus, des IHC d' α -SMA ont été réalisées afin de quantifier la muscularisation des micro-vaisseaux. Des marquages IHC ont été réalisés chez l'Homme sur des coupes pulmonaires de patients MVOPh, MVOPs et les contrôles afin de mettre en évidence l'expression de protéines impliquées dans la prolifération (Ki67) ainsi que des marqueurs d'activation de la RIS (HO-1 et CHOP) au sein des cellules endothéliales (CD31⁺).

Des mesures électrophysiologiques des courants potassiques globaux ainsi que du courant KCNK3 ont été réalisées sur les CML de rates exposées à la MMC.

Dans cette étude nous avons mesuré l'expression de nombreuses protéines par Western Blot chez les rats MMC, les rats GCN2 KO ainsi que dans les tissus pulmonaires humains de patients MVOPh, MVOPs et contrôles (p-eiF2 α , p-P38, p-ERK1/2, Survivin, Twist-1, p-120 catenin, cleaved caspase-3, CD45, ERG, p-GCN2, GCN2, p-PERK, PERK, PKR, GCN1, CHOP, HO-1, ATF4, p-SMAD2/3, SMAD 2/3, p-SMAD 1/5/9, SMAD 1/5/9, BMPR2, PCNA, mTOR, p-mTOR et β -Actin).

Des qPCR Array ont été également utilisés afin d'explorer l'expression des gènes de la RIS et de la voie du BMP.

Enfin, un dosage par LC/MS a été utilisé afin de mesurer le taux de sérotonine pulmonaire chez les rats MMC.

4- Résultats

Au niveau histologique, un remodelage initial des artères pulmonaires de petit diamètre (70 à 250 μ m) qui amène à une réduction de la lumière de ces vaisseaux est observable dès la semaine 1 après la 1^{ère} injection de MMC. Une néo-muscularisation des artères est observable à partir de la semaine 2 et s'intensifie jusqu'à la semaine 4. De la même manière, une réduction de la lumière des veines est observée à partir de la semaine 2 (20%) et s'intensifie jusqu'à la semaine 5 (50%). Enfin, une fibrose intimale des veines septales et des veinules pré-septales a été mise en évidence uniquement à la semaine 5.

L'hypertrophie ventriculaire droite, consécutive à l'augmentation des pressions artérielles pulmonaires est mesurée par l'index de Fulton et ce dernier est significativement augmenté chez les rats MMC à partir de la semaine 4.

L'impact de la Mitomycine-C sur la fonction cardiaque a été mesuré par échocardiographie. La présence d'une pathologie vasculaire pulmonaire est confirmée par une diminution significative du PAAT chez les animaux injectés à la MMC dès la première semaine de manière concomitante à la réduction de la lumière artérielle observée en analyse histologique. Ces animaux présentent une diminution du débit cardiaque (CO), une diminution transitoire de la fraction de raccourcissement du ventricule gauche liée à une diminution du diamètre du ventricule gauche en diastole sans hypertrophie gauche.

Concernant la caractérisation moléculaire du modèle, l'expression de la protéine GCN2 est perdue, comme dans les formes hérissables de MVOP humaines. Chez le rat MMC, les autres kinases de la RIS sont surexprimées à la suite de cette perte de GCN2 tout comme le co-activateur de GCN2 (GCN1) ainsi que les effecteurs (ATF4, CHOP et HO-1). Cependant, la phosphorylation de eIF2 α n'est pas modifiée, ce qui semble indiquer un effet indépendant de la phosphorylation de eIF2 α . En revanche, chez l'Homme seuls les effecteurs de la RIS (HO-1 et CHOP) sont augmentés dans les MVOPh et MVOPs.

La balance entre la voie BMP et la voie du TGF- β a été explorée en regardant l'expression de la phosphorylation des SMAD1/5/9 (voie du BMP) et l'expression de la phosphorylation des SMAD 2/3 (voie du TGF- β). Dans le modèle MMC, la voie du BMP est drastiquement diminuée à partir de la semaine 4 au profit de la voie du TGF- β . Cette perte de la balance de la voie BMP/TGF- β est également observée chez l'Homme dans les deux formes de MVOP.

De manière concomitante, les rats MMC présentent une augmentation des voies de prolifération à partir de la semaine 4 via une augmentation de la phosphorylation de p38, ERK1/2 ainsi qu'une augmentation d'expression de PCNA. Ces altérations moléculaires concordent avec le remodelage veineux observé en histologie. De la même manière les voies de survie sont également augmentées via une augmentation de l'expression de la survivine dans ce modèle.

Une augmentation d'expression de Twist-1 et la perte de la protéine jonctionnelle p120-caténine indiquent une transition endothélio-mésenchymateuse dans ce modèle animal.

De manière surprenante, il a également été observé une augmentation des voies pro-apoptotiques via une augmentation de l'expression de la forme clivée de la capsase-3. Cette augmentation de l'apoptose cellulaire peut s'expliquer en partie par le recrutement important

de cellules inflammatoires (augmentation de l'expression du marqueur CD45) qui ont un temps de renouvellement rapide.

Le facteur ERG, décrit comme étant impliqué dans la physiopathologie de la MVOP chez la souris est également diminué dans ce modèle de rat MMC.

Dans ce modèle, il a également été observé une augmentation de l'expression de la sérotonine (5-HT) à partir de la semaine 4. Or la sérotonine peut transactiver les récepteurs au PDGF et ainsi augmenter la prolifération des CMLs vasculaires pulmonaires.

Enfin, les CMLs de rat MMC présentent une diminution du courant K⁺ KCNK3 spécifique ainsi que les canaux ioniques Kv. Cette perte de canaux potassiques induit une dépolarisation des cellules musculaires lisses et favorise ainsi la vasoconstriction et contribue ainsi à l'obstruction des vaisseaux pulmonaires.

La néo-expression des effecteurs de la RIS est spécifique des patients MVO car ces protéines n'ont pas été retrouvées dans les marquages des coupes de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les contrôles. Par ailleurs, cette expression était majoritairement localisée proche des cellules endothéliales en prolifération (marquage CD31⁺/ Ki67⁺).

Afin d'expliquer le lien entre GCN2 et BMPRII, nous avons pu confirmer que la perte de GCN2 diminuait la phosphorylation des SMAD 1/5/9 avec les tissus pulmonaires de rat GCN2 KO ainsi que par siGCN2 ou inhibition pharmacologique dans des cellules endothéliales en culture.

Pour comprendre et identifier le lien entre les 2 voies de signalisation, nous avons analysé l'effet de l'activation de GCN2 (traitement des CE par l'Histidinol 0,5 mM) sur la voie du BMP ainsi que la voie du BMP sur la voie de la RIS (traitement des CE au BMP-9 20ng/ml). L'Histidinol est un inhibiteur de l'histidyl-tRNA synthetase et ainsi mime une carence en histidine qui a pour effet d'activer GCN2 (Hansen et al., 1972; Vaughan and Hansen, 1973). Nos résultats suggèrent un rétrocontrôle négatif de la voie du BMP sur la voie de la RIS notamment via la diminution de certains gènes impliqués dans la réponse au stress du RE (*BCL2L11*), les processus apoptotiques (*PMAIP1*), la régulation de la traduction (*RPL7*), et l'autophagie (*SQSTM1*). Concernant la connexion entre la voie BMP et RIS, nous avons montré que l'activation de GCN2, diminue l'expression de la chordine (*CHRD*) qui est une protéine extracellulaire responsable de la séquestration du BMP dans le milieu extracellulaire. La perte de GCN2 dans la MVOP et le modèle MMC pourraient donc entraîner une plus forte expression

de la chordine qui séquestrerait les BMPs et ainsi diminuerait la liaison sur BMPRII et donc la phosphorylation des SMAD 1/5/9.

Enfin nos expériences montrent que la protéine GCN2 peut contrôler directement ou indirectement la voie du BMP mais que son activité est soumise au contrôle de la protéine mTORC1 de par son lien avec GCN2 sur l'abondance en acides aminés.

5-Discussion

Nos résultats démontrent que ces animaux développent une hypertension artérielle pulmonaire à partir de 4^{ème} semaine d'exposition à la MMC. Histologiquement, nous observons une réduction rapide de la lumière des petites artères et veines qui peut être expliquée par une vasoconstriction liée à la perte de KCNK3 (Olschewski et al., 2017) dans un premier temps puis par un remodelage vasculaire progressif des vaisseaux pulmonaires lié à l'activation des voies de prolifération.

Il est connu que la MMC est impliquée dans le développement de la MVO mais également des cardiomyopathies. L'idée que le remodelage veineux observé dans notre modèle peut être secondaire à une maladie du cœur gauche a été explorée (Fayyaz et al., 2018). La MMC est associée à la cardio-toxicité chez des patients qui ont reçu préalablement un traitement à la doxorubicine ce qui suggère des effets synergiques des deux molécules. Les patients ayant reçu de la MMC sans doxorubicine ne présentaient pas de dysfonction ventriculaire gauche (Pai and Nahata, 2000).

Afin de vérifier la cardio-toxicité de la MMC sur l'animal, nous avons conduit des expériences d'échocardiographie afin d'analyser l'impact de la MMC sur la fonction ventriculaire gauche. Nos observations montrent un effet transitoire de la MMC sur le cœur gauche mais cet effet est précédé par la diminution du PAAT, donc l'augmentation de la postcharge apparaît avant l'altération gauche transitoire. Ces résultats contredisent donc l'hypothèse d'un remodelage veineux consécutif à une dysfonction du cœur gauche. L'ensemble de ces données confirme que le modèle MMC est bien un modèle de MVO et non pas d'une HTP du groupe II.

Au niveau moléculaire, le modèle présente une diminution d'expression de GCN2 et une surexpression des autres kinases de la RIS. Par ailleurs, la phosphorylation d'eIF2 α n'est pas modifiée mais une surexpression des effecteurs de cette voie sont augmentés (ATF4, CHOP et HO-1). Or deux de ces facteurs de la RIS, CHOP et HO-1 sont également surexprimés dans les

formes héritables et sporadiques de MVO, ce qui suggère que la dysfonction de GCN2 est associée à la surexpression de ces 2 facteurs. Par ailleurs, nous avons montré *in vitro*, que l'ajout de BMP-9 sur les CE diminue l'activation de la RIS.

La surexpression des autres kinases pourrait être une forme de compensation liée à la perte de GCN2 malgré le fait que ces protéines répondent à des stress très différents (stress du réticulum endoplasmique pour PERK, carence en hème pour HRI, et infection virale pour PKR). Par ailleurs, l'augmentation d'expression des effecteurs de la voie de la RIS semble être indépendante de la phosphorylation de eIF2 α . Cela indiquerait un mécanisme très peu décrit dans la littérature. Cependant, la phosphorylation de eIF2 α étant très fortement régulée par des phosphatases (GADD34 et GADD45) (Pakos-Zebrucka et al., 2016), ce rétrocontrôle rapide peut masquer une activation transitoire d'eIF2 α , ce qui pourrait expliquer que nous n'ayons pas pu la détecter.

Ce modèle présente un grand nombre d'altérations de processus cellulaires connues comme étant impliquées dans le développement des HTAP (voie de la sérotonine, inflammation, apoptose, prolifération, perte de courants potassiques, perte de la balance BMP/TGF- β).

La perte de la balance entre la voie du BMP et du TGF- β est un processus qui contribue à la dysfonction endothéliale, au remodelage vasculaire, l'inflammation et une angiogenèse désorganisée dans l'HTAP (Tielemans et al., 2019). Nous avons voulu explorer si cet aspect pouvait être altéré dans la MVO. Nos résultats suggèrent que GCN2 joue un rôle dans le contrôle de la voie du BMP car l'inhibition pharmacologique et par si-ARN de GCN2 diminue la phosphorylation des SMAD 1/5/9 dans les CE humaines. De plus, l'activation des SMAD1/5/9 est également diminuée dans les patients atteints de forme héritable de MVO et chez les rats *Gcn2*^{-/-}. Les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires pourraient être plus affectées car elles expriment plus fortement le récepteur BMPR2 que les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (Upton et al., 2008). Nous avons montré que l'ajout de BMP-9 est capable d'inverser la prolifération des CE induite par la perte de GCN2 et le BMP-9 seul n'a aucun effet. Cela supporte l'hypothèse que les effets prolifératifs de GCN2 passent par la voie dépendante du BMP-9, donc la voie BMPR2-SMAD 1/5/9. Cependant, nous n'avons pas exploré les voies indépendantes des SMADs.

Nous avons également montré *in vivo* que la perte de GCN2 induit une augmentation de l'expression de la chordine. La chordine est diminuée *in vitro* lorsque nous avons activé

pharmacologiquement GCN2 par l'Histidinol. Or la chordine est un antagoniste extracellulaire naturel des BMPs en empêchant leur fixation sur leur récepteur (Troilo et al., 2014).

Enfin, nos expériences d'IHC montrent que HO-1 est exprimé dans les foyers d'hémangiomatose capillaire qui sont des lieux de prolifération endothéliale intenses et spécifiques de la MVO. Or HO-1 est connu pour favoriser la prolifération des CEs et la formation des vaisseaux *in vitro* et inversement. En effet, les cellules endothéliales de souris KO pour HO-1 présentent une prolifération plus faible (Deramaudt et al., 1998; Deshane et al., 2007; Dey et al., 2015). Ces informations font de HO-1 une cible intéressante pour le traitement de la MVO.

6- Conclusion

Notre étude dresse un tableau des altérations histologiques et moléculaires présentes dans les formes humaines et expérimentales de MVO. Nous avons démontré que l'exposition à la MMC est associée à un remodelage artériel et veineux. De plus, dans toutes les formes de MVO testées, les effecteurs de la RIS CHOP et HO-1 sont surexprimés de manière GCN2 dépendante mais eIF2a indépendante.

Grâce aux IHC, nous avons démontré que CHOP et HO-1 sont impliqués dans la pathobiologie de la MVO car ils sont exprimés dans les cellules endothéliales et les foyers d'hémangiomatose capillaire. Enfin, nos travaux montrent que la perte de GCN2 régule négativement l'activation des SMAD 1/5/9 et que l'ajout de BMP-9 est bénéfique notamment en annulant la prolifération des CE induite par la perte de GCN2.

L'inhibition de HO-1 et CHOP ou l'ajout de BMP-9 devraient être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour la MVO.

7- Perspectives

Au cours de ce projet nous avons pu observer les nombreuses altérations histologiques et moléculaires présentes dans les formes humaines et expérimentales de la maladie veino-occlusive pulmonaire. Notre étude met en lumière des altérations de voies de signalisation similaires entre les deux formes étudiées. Cependant, il reste plusieurs points à explorer de manière plus profonde.

- La perte d'activation de la voie BMP au profit de la voie du TGF- β
- Le lien moléculaire entre GCN2 et la voie du BMP

7-1 Etude de la perte d'activation de la voie BMP au profit de la voie du TGF- β

La perte de la balance entre la voie BMP et du TGF- β contribue à la dysfonction endothéliale, la remodelage vasculaire, l'inflammation et à une angiogenèse désorganisée dans l'HTAP (Tielemans et al., 2019). Nous avons montré que la perte de GCN2 était impliquée dans la perte de l'activation de la voie du BMP par les expériences de si-ARN, l'inhibition pharmacologique de GCN2 (compound 2662034) ainsi qu'avec les rats *Eif2ak4*^{-/-}. Cependant, il est nécessaire de comprendre comment la perte de GCN2 est impliquée dans l'activation de la voie du TGF- β .

Une première piste moléculaire serait un partenaire protéique de GCN2. En effet, une étude de (Rodriguez-Hernandez et al., 2003) chez la levure démontre une interaction entre GCN2 et la protéine FKBP1-2. Or cette protéine est décrite comme un inhibiteur de mTORC1 (Hirsch et al., 2016; Yoon et al., 2011) ainsi qu'un inhibiteur de l'activation du récepteur TGF- β R1 (Stockwell and Schreiber, 1998) et un inhibiteur de son internalisation (Yao et al., 2000).

De manière fort intéressante, l'ARNm de cette protéine est diminuée de manière significative dans les 4 premières semaines du modèle MMC (Figure 44). Cette diminution pourrait expliquer l'augmentation de l'activation de la voie du TGF- β par la diminution du frein qu'exerce normalement cette protéine sur ce récepteur.

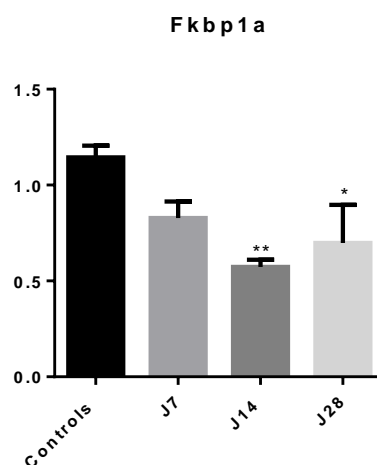


Figure 44 : Expression de l'ARNm de Fkbp1a chez le modèle de rat MMC comparé à des rats contrôles.

Il serait donc intéressant d'aller étudier plus en profondeur si l'ARNm de FKBP1-2 est également diminué dans les formes humaines de MVO dans un premier temps puis confirmer l'hypothèse en regardant l'expression protéique de FKBP1-2 et de ses effecteurs (phosphorylation de mTORC1 et TGF- β 1).

Par la suite, une confirmation *in vitro* sur cellules vasculaires pulmonaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) serait nécessaire en étudiant ces mêmes effecteurs (p-mTORC1 et TGF- β 1) après une activation ou inhibition pharmacologique de GCN2 ainsi que FKBP1-2.

Enfin, des études *in vivo* sur le rat avec l'utilisation d'inhibiteur de FKBP1-2 permettraient d'identifier FKBP1-2 comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la MVO.

7-2 Etude du lien moléculaire entre GCN2 et la voie du BMP

Nos résultats suggèrent que mTORC1 contrôle l'activité de GCN2 et qu'en retour ce dernier module l'activité de la voie BMP. Cependant, le lien entre GCN2 et la voie du BMP n'est toujours pas complètement élucidé. Nous avons montré *in vitro* que l'activation pharmacologique de GCN2 induisait une diminution importante de l'expression de la chordine (CHRD). Or la chordine est un inhibiteur extracellulaire endogène qui empêche la fixation des BMPs sur son récepteur et ainsi inhibe l'activation de la voie de signalisation dépendante de BMPR2.

De nouvelles études sont donc requises pour confirmer et explorer plus en détail le rôle de la chordine dans la signalisation de la voie du BMP dépendante de GCN2. Notamment en regardant l'expression de protéines impliquées dans l'activation de la chordine (Figure 45) (Troilo et al., 2014, 2015) à la fois chez l'humain et dans le modèle expérimental de MVO tel que Twisted Gastrulation (TSG) ou les métalloprotéases de la famille des Tolloids (TLL1 et TLL2)

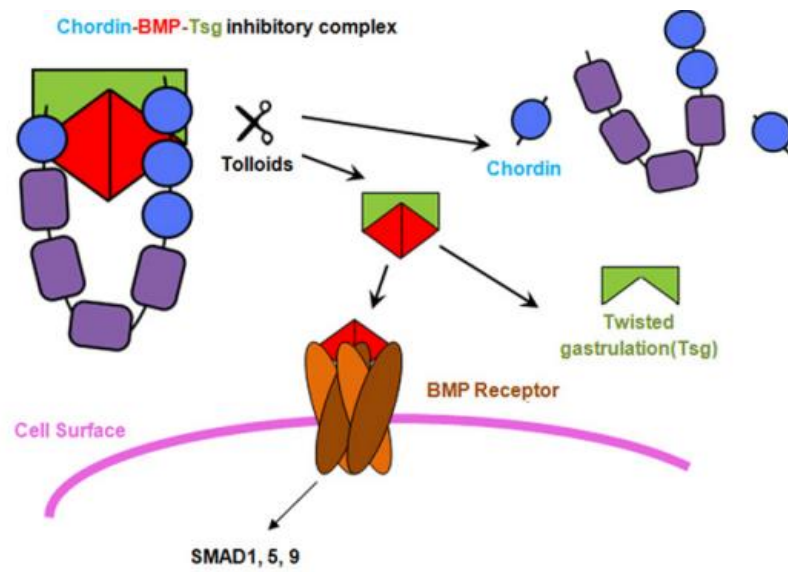


Figure 45 : Modèle présentant le mécanisme de régulation des BMPs par la Chordine. Les BMPs se lient à la chordine et forment un complexe inhibiteur qui est renforcé par Twisted Gastrulation (Tsg). Les métalloprotéases de la famille des tolloids fragmentent la chordine. Twisted gastrulation est libéré et le BMP peut se fixer à son récepteur et activer les voies de signalisation associées.

8- Publication



ORIGINAL RESEARCH

Comparison of Human and Experimental Pulmonary Veno-Occlusive Disease

Grégoire Manaud^{1,2,3*}, Esther J. Nossent^{4*}, Mélanie Lambert^{1,2,3}, Maria-Rosa Ghigna⁵, Angèle Boët⁶, Maria-Candida Vinhas⁶, Benoit Ranchoux^{1,2,3}, Sébastien J. Dumas^{1,2,3}, Audrey Courboulin^{1,2,3}, Barbara Girerd^{1,2,3}, Florent Soubrier⁷, Juliette Bignard⁷, Olivier Claude⁷, Florence Lecerf^{1,2,3}, Aurélie Hautefort^{1,2,3}, Monica Florio⁸, Banghua Sun⁸, Sophie Nadaud⁷, Stijn E. Verleden⁹, Séverine Remy¹⁰, Ignacio Anegón¹⁰, Harm Jan Bogaard⁴, Olaf Mercier^{1,2,3,11}, Elie Fadel^{1,2,3,11}, Gérald Simonneau^{1,2,3}, Anton Vonk Noordegraaf⁴, Katrien Grünberg⁴, Marc Humbert^{1,2,3}, David Montani^{1,2,3}, Peter Dorfmueller^{1,2,3,5,12}, Fabrice Antigny^{1,2,3*}, and Frédéric Perros^{1,2,3*}

¹Université Paris-Saclay-Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²AP-HP, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³UMRS 999, INSERM and Université Paris-Saclay, Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, and ¹¹Service de Chirurgie Thoracique, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France; ⁴Amsterdam UMC, Vrije Universiteit Amsterdam, Pulmonary Medicine, Amsterdam Cardiovascular Sciences, Amsterdam, the Netherlands; ⁵Department of Pathology and ⁶Department of Research, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ⁷INSERM UMR S 956, Pierre and Marie Curie Université (Paris 06), Paris, France; ⁸Cardio-Metabolic Disorders, Amgen Research, Amgen Inc., Thousand Oaks, California; ⁹Laboratory of Respiratory Diseases and Thoracic Surgery, Department of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing KU Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁰INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology-ITUN et Transgenic Rats and Immunophenomic Platform, Nantes, France; and ¹²Department of Pathology, University of Giessen and Marburg Lung Center, Justus-Liebig University Giessen, German Center for Lung Research, Giessen, Germany

ORCID IDs: 0000-0001-5996-665X (M.-R.G.); 0000-0001-7692-3395 (O.C.); 0000-0002-1452-6009 (S.N.); 0000-0003-0703-2892 (M.H.); 0000-0002-9358-6922 (D.M.); 0000-0002-9515-6571 (F.A.); 0000-0001-7730-2427 (F.P.).

Abstract

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) occurs in humans either as a heritable form (hPVOD) due to biallelic inactivating mutations of *EIF2AK4* (encoding GCN2) or as a sporadic form in older age (sPVOD). The chemotherapeutic agent mitomycin C (MMC) is a potent inducer of PVOD in humans and in rats (MMC-PVOD). Here, we compared human hPVOD and sPVOD, and MMC-PVOD pathophysiology at the histological, cellular, and molecular levels to unravel common altered pathomechanisms. MMC exposure in rats was associated primarily with arterial and microvessel remodeling, and secondarily by venous remodeling, when PVOD became symptomatic. In all forms of PVOD tested, there was convergent GCN2-dependent but eIF2 α -independent pulmonary protein overexpression of HO-1 (heme oxygenase 1) and CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein [C/EBP] homologous protein), two downstream effectors of GCN2 signaling and endoplasmic reticulum stress. In human PVOD samples, CHOP

immunohistochemical staining mainly labeled endothelial cells in remodeled veins and arteries. Strong HO-1 staining was observed only within capillary hemangiomatosis foci, where intense microvascular proliferation occurs. HO-1 and CHOP stainings were not observed in control and pulmonary arterial hypertension lung tissues, supporting the specificity for CHOP and HO-1 involvement in PVOD pathobiology. *In vivo* loss of GCN2 (*EIF2AK4* mutations carriers and *Eif2ak4*^{-/-} rats) or *in vitro* GCN2 inhibition in cultured pulmonary artery endothelial cells using pharmacological and siRNA approaches demonstrated that GCN2 loss of function negatively regulates BMP (bone morphogenetic protein)-dependent SMAD1/5/9 signaling. Exogenous BMP9 was still able to reverse GCN2 inhibition-induced proliferation of pulmonary artery endothelial cells. In conclusion, we identified CHOP and HO-1 inhibition, and BMP9, as potential therapeutic options for PVOD.

Keywords: pulmonary hypertension; pulmonary veno-occlusive disease; GCN2; SMAD signaling; BMP9-II

(Received in original form January 8, 2019; accepted in final form March 24, 2020)

*These authors contributed equally to this work.

Supported by the French National Research Agency (ANR-13-JSV1-0011-01); a Pulmonary Vascular Research Institute BMPR2 Research Grant supported by the Dinosaur Trust (F.P.); Département Hospitalo-Universitaire Thorax Innovation and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay; and Hôpital Marie Lannelongue. G.M. is a 2017 Laureate of Fonds de Recherche en Santé Respiratoire et de la Fondation du Souffle. F.A. received funding from the Fondation du Souffle et Fonds de Dotation Recherche en Santé Respiratoire, the Fondation Lefoulon-Delalande, and the Fondation Legs Poix. F.A. also received funding from the National Funding Agency for Research (ANR-18-CE14-0023). M.L. was supported by the Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569). E.J.N. was supported by a European Respiratory Society PAH Long-Term Research Fellowship. S.E.V. was supported by a postdoctoral fellowship from FWO (12G8718N) and a grant from KU Leuven (C24/18/073).

This article has a data supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org.

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 63, Iss 1, pp 118–131, Jul 2020

Copyright © 2020 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rncmb.2019-00150C on March 25, 2020

Internet address: www.atsjournals.org

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) is a rare form of pulmonary hypertension (PH) (1) characterized by widespread fibrous intimal proliferation and muscular hyperplasia of septal veins and preseptal venules, pulmonary capillary congestion, and hemangiomatosis-like proliferation. PVOD is associated with a poor response to available therapy for pulmonary arterial hypertension, and to date, lung transplantation remains the treatment of choice (1, 2).

The pathobiology of PVOD has been poorly explored. However, biallelic mutations in the *EIF2AK4* (eukaryotic initiation factor 2 α kinase 4) gene cause autosomal-recessive heritable PVOD (hPVOD) (3). A sporadic form of PVOD (sPVOD) has also been described, in particular in the context of occupational exposure to organic solvents or treatment with specific chemotherapeutic agents (1, 2, 4).

The *EIF2AK4* gene codes for GCN2 (general control nonderepressible 2), a serine-threonine kinase that has been reported to change gene expression in response to amino acid deprivation and to play a key role in immune tolerance to cells undergoing apoptosis (5). GCN2 belongs to a family of four kinases that phosphorylate the α -subunit of eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α). These four serine-threonine kinases (GCN2, PERK [PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase], PKR [protein kinase double-stranded RNA-dependent], and HRI [heme-regulated inhibitor]) are involved in the control of general translation in response to various cellular stresses (6). Phosphorylation of eIF2 α protects cells by reducing protein synthesis and regulating changes in the expression of genes involved in stress response, defined as the “integrated stress response” (ISR) (6). These genes are involved in a variety of cellular mechanisms, such as resistance to oxidative stress, inflammation, cell survival, autophagy, and angiogenesis. However, the role of GCN2 and ISR in pulmonary vascular remodeling leading to PVOD remains to be elucidated. Indeed, the lack of animal models that recapitulate PVOD

disease, as well as the lack of molecular studies on human PVOD, explain our lack of knowledge regarding this condition. However, one study, by Lathen and colleagues, identified that suppression of the Ets family of transcription factors (ERG) promotes the development of a PVOD-like disease in mice (7).

Our group has previously demonstrated the role of mitomycin C (MMC) both in humans and in a rat model of the disease (MMC-PVOD), and other toxic compounds in human sPVOD (8).

Here, we compared hPVOD, sPVOD, and MMC-PVOD pathophysiology to obtain more insight into the histological, cellular, and molecular alterations that steer disease progression. This comparison should allow the discovery of common altered signaling pathways that could be targeted by novel therapeutic agents. Although most attention has been focused on postcapillary vascular remodeling, pulmonary arterial intimal fibrosis and thickening of the muscular media are always observed in PVOD, and it is still unclear whether these lesions represent primary changes or are a secondary cause of postcapillary remodeling. We clarified this point by quantifying and qualifying the progressive vascular remodeling that occurs in the MMC-PVOD model.

Methods

Details regarding the methods used in this work are provided in the data supplement.

Results

Human data are presented after the animal data.

Analysis of the MMC-PVOD Model

Histopathology of PVOD induced by MMC exposure in rats. Morphometric analysis of five groups of rats exposed to MMC (at Weeks 1, 2, 3, 4, and 5 [W1, W2, W3, W4, and W5] after MMC exposure) and

untreated control rats showed initial narrowing within the pulmonary arteries (70–250 μ m in diameter), with an important and rather sudden reduction of the patent lumen area of \sim 50% from W1 (after MMC exposure) (Figure 1). These first changes were followed by mild but significant muscularization of microvessels ($<$ 70 μ m in diameter) from W2 on that intensified with moderate and severe remodeling from W4 (Figures 1 and 2). A significant pulmonary venous patent lumen area reduction of \sim 20% was observed from W3 and intensified with lumen reduction to \geq 50% in the next 2 weeks (Figures 1 and 2).

Concerning the quality of pulmonary arterial remodeling, media hyperplasia/hypertrophy was the prominent finding in early stages, whereas intimal fibrosis was observed only at W5 (Figure 2C).

Disease progression. Compensatory right ventricular hypertrophy due to increased pulmonary arterial pressures, as qualified by the Fulton index (ratio of right ventricular to left ventricular [LV] and septal weight), was significantly increased as compared with controls at W4 of our kinetic study (Figure 2F), demonstrating that PH became symptomatic 4 weeks after the first MMC exposure.

Molecular characterization of the MMC-induced PVOD rat model.

OVEREXPRESSION OF ISR KINASES AND ISR EFFECTORS. Pulmonary GCN2 content was dramatically decreased as soon as 2 weeks after MMC exposure and was weakly expressed along the progression of the disease. More precisely, GCN2 expression was progressively decreased along the disease progression: by 40% after 1 week, by 50% after 2 weeks of MMC exposure, and by 85–90% after 4 and 5 weeks of MMC exposure (Figure 3A). Parallel to the GCN2 loss of expression, we observed a progressive and sequential overexpression of PERK (1.7-, 1.8-, 1.6-, and 1.9-fold increase at W2, W3, W4, and W5, respectively), PKR (2.5-, 5-, and 6-fold increase at W3, W4, and W5, respectively), and GCN1 (GCN2 coactivator) (2- and 2.5-fold increase at W3 and W4, respectively) (Figure 3A).

Author Contributions: Conception and design: E.J.N., I.A., D.M., P.D., F.A., and F.P. Acquisition of data: G.M., E.J.N., M.L., M.-R.G., A.B., M.-C.V., B.R., S.J.D., A.C., J.B., O.C., F.L., A.H., M.F., B.S., S.E.V., S.R., F.A., and F.P. Analysis and interpretation: G.M., E.J.N., M.L., M.-R.G., A.B., B.R., S.J.D., A.C., F.L., A.H., M.F., B.S., P.D., F.A., and F.P. Drafting the manuscript for important intellectual content: G.M., E.J.N., M.-R.G., B.G., F.S., S.N., H.J.B., O.M., E.F., G.S., A.V.N., K.G., M.H., D.M., P.D., F.A., and F.P.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Frédéric Perros, Ph.D., INSERM U999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. E-mail: frederic.perros@inserm.fr.

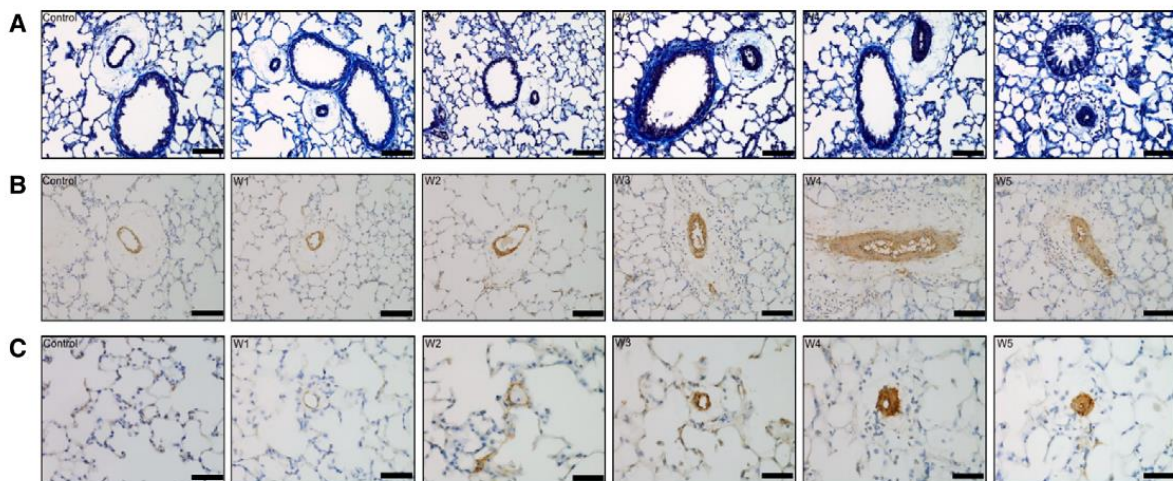


Figure 1. Mitomycin C (MMC) induces remodeling of the pulmonary arteries, veins, and microvessels in rats. (A) Pulmonary artery adjacent to a bronchus showing progressive hyperplasia/hypertrophy of the media with narrowing of the lumen at Weeks 1, 2, 3, 4, and 5 (W1, W2, W3, W4, and W5; Trichrome/Weigert staining). (B) Pulmonary vein displaying progressive muscularization of the wall and narrowing of the lumen at W1, W2, W3, W4, and W5 (α -SMA immunohistochemistry). (C) Microvessels showing progressive remodeling with muscularization of the wall and progressive obstruction of the lumen at W1, W2, W3, W4, and W5 (α -SMA immunohistochemistry). Scale bars: 100 μ m (A and B) and 50 μ m (C). α -SMA = α -smooth muscle actin.

As illustrated in Figure 3, stress-response kinases are known to phosphorylate the α -subunit of eIF2 α , which in turn should activate ATF4 (activating transcription factor 4). Unexpectedly, the phosphorylation state of eIF2 α was not significantly affected (Figure E1 in the data supplement) and, paradoxically, the downstream effector of eIF2 α , ATF4, was strongly increased 4 and 5 weeks after MMC exposure (Figure 3B). ATF4 is known to induce expression of another transcription factor, CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein [C/EBP] homologous protein), and to induce heme oxygenase 1 (HO-1) (9). As displayed in Figure 3B, expression of CHOP and HO-1 was increased three- to fourfold 4 and 5 weeks after MMC exposure.

BMPRII AND TGF- β IMBALANCE IN LUNGS FROM MMC-EXPOSED RATS. Impaired BMPRII (BMP receptor type II) signaling is a common pathogenic mechanism of various forms of pulmonary arterial hypertension (PAH) (10). We showed that lung BMPRII expression was not modified in PVOD animals (Figure 3C), whereas the phosphorylation status of SMAD1/5/8 (downstream BMPRII signaling) was severely reduced at 4 weeks and beyond after MMC exposure (Figure 3C). The phosphorylation status of SMAD2/3 (TGF- β [transforming growth factor β]

signaling) was remarkably increased 4 and 5 weeks after MMC exposure (Figure 3C).

UPREGULATION OF MITOGENIC, ANTIAPOPTOTIC, AND DIFFERENTIATION PATHWAYS IN MMC-EXPOSED RATS. The MAPK pathways play a critical role in the regulation of cell proliferation (11). We showed a progressive increased phosphorylation of P38 from the third week to the fifth week after MMC exposure. We also observed an increase in ERK1/2 phosphorylation at 4 and 5 weeks after MMC exposure (Figure E2). This activation of the MAPK signaling pathway suggests that proliferation processes are ongoing at these time points and contribute to the pulmonary vascular remodeling observed in MMC-exposed rats. Accordingly, expression of PCNA (proliferating cell nuclear antigen, a proliferation marker) was significantly increased at these time points (10-fold at W4 and W5) (Figure E2), confirming the unleashed proliferation of pulmonary vascular cells in MMC-exposed lungs (12).

In addition, we demonstrated a strong increase in expression of the antiapoptotic protein survivin at 4 and 5 weeks after MMC exposure (Figure E2), which may have contributed to the obstructive accumulation of death-resistant pulmonary vascular cells in MMC-exposed rats.

In line with the upregulation of mitogenic and antiapoptotic pathways, we

found that microvascular and venous lesions were predominantly characterized by muscular hyperplasia; intimal fibrosis was generally not observed. Foci of alveolar wall thickening suggestive of pulmonary capillary hemangiomatosis became just perceivable at W3 and showed obvious progression at W4 and W5 (Figure E3). In relation to the aberrant growth and accumulation of pulmonary mesenchymal cells, we demonstrated that the mesenchymal transition-promoting transcription factor Twist1 was severely increased 4 and 5 weeks after MMC exposure (Figure E4). The expression of p120-catenin, which maintains cell-cell junctions, was dramatically decreased during the last 3 weeks of disease induced by MMC exposure (W3, W4, and W5) (Figure E5).

LATE APOPTOSIS AND INFLAMMATION. Despite the pulmonary upregulation of mitogenic and antiapoptotic pathways 4 and 5 weeks after MMC exposure, we also found that the active form of Caspase 3 (cleaved caspase 3), which is a critical executioner of apoptosis, was dramatically increased in lungs from MMC-exposed rats at the same time points (Figure E6). Cleaved Caspase 9 expression was not significantly affected by MMC exposure (data not shown). This apoptosis could be related to the pulmonary inflammation (high leukocyte turnover) that was detected via quantification of the pan-leukocyte

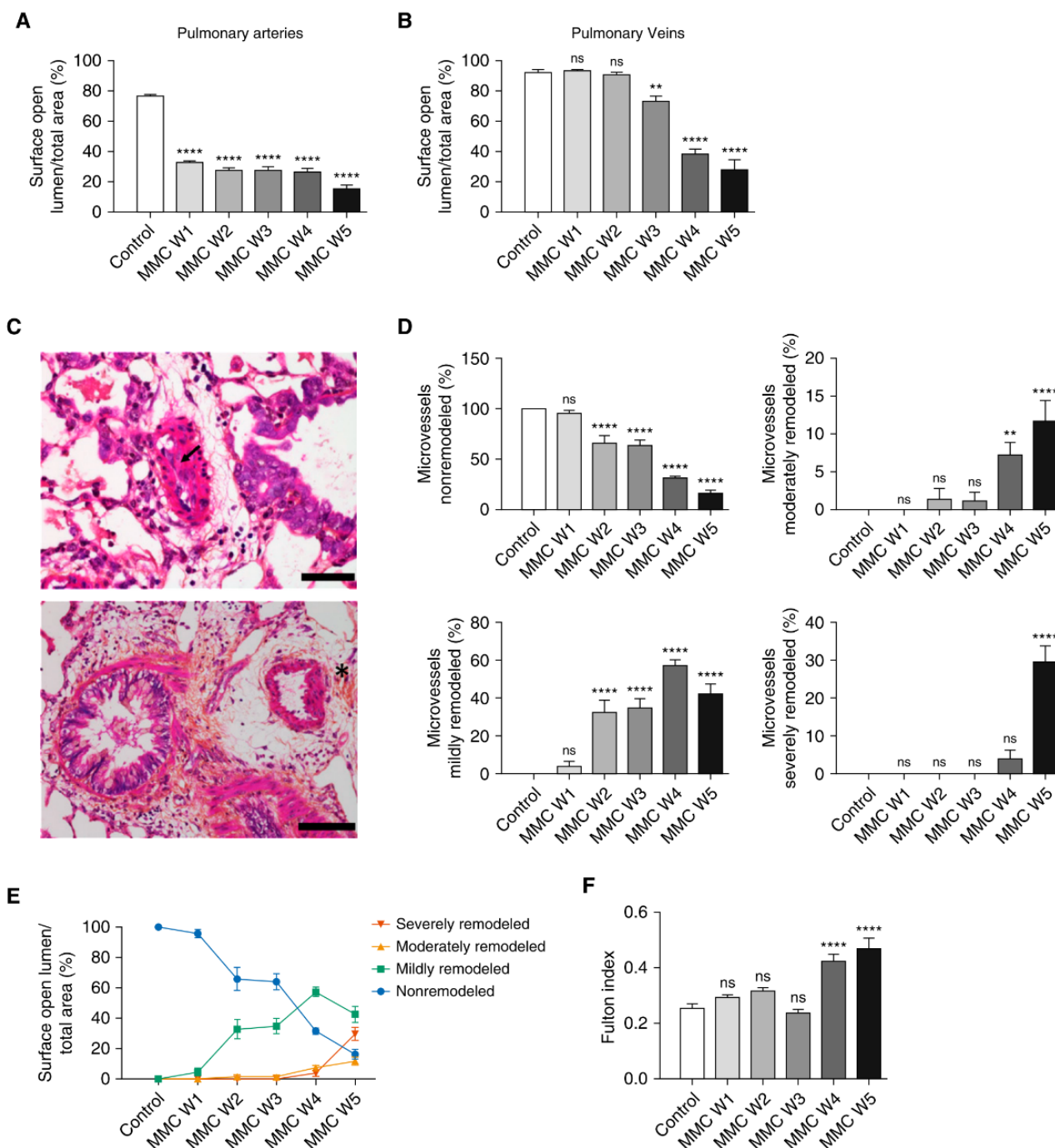


Figure 2. MMC induces pulmonary vascular remodeling in rats. (A) Surface open lumen/total area (%) of pulmonary arteries, showing a significant change ($P < 0.0001$) at W1 with progressive narrowing of the lumen in comparison with controls. (B) Surface open lumen/total area (%) of pulmonary veins, showing a significant change ($P < 0.005$) at W3 with progressive narrowing of the lumen in comparison with controls. (C) Pulmonary artery at W5 with intimal fibrosis (arrow) (hematoxylin and eosin staining) and pulmonary artery with pronounced adventitial fibrosis (*) (Hemtoxylene eosin and safran staining). Scale bars: 100 μm. (D) Nonremodeled microvessels are significantly reduced from W2 ($P < 0.00001$). Mild remodeling of microvessels is already observed in W1 but becomes more pronounced every week, with a significant change in W2 ($P < 0.00001$). Moderate remodeling of the microvessels becomes abundant at W4 ($P < 0.005$), and severe remodeling occurs later on in W5 ($P < 0.005$). (E) Remodeling of microvessels over time at W1, W2, W3, W4, and W5, showing that moderate (orange) and severe (red) remodeling of microvessels is a late feature of disease development. (F) The Fulton index (ratio of right ventricular to left ventricular and septal weight) was significantly increased ($P < 0.0001$) at W4 in comparison with controls. ** $P < 0.005$ and **** $P < 0.0001$. ns = not significant.

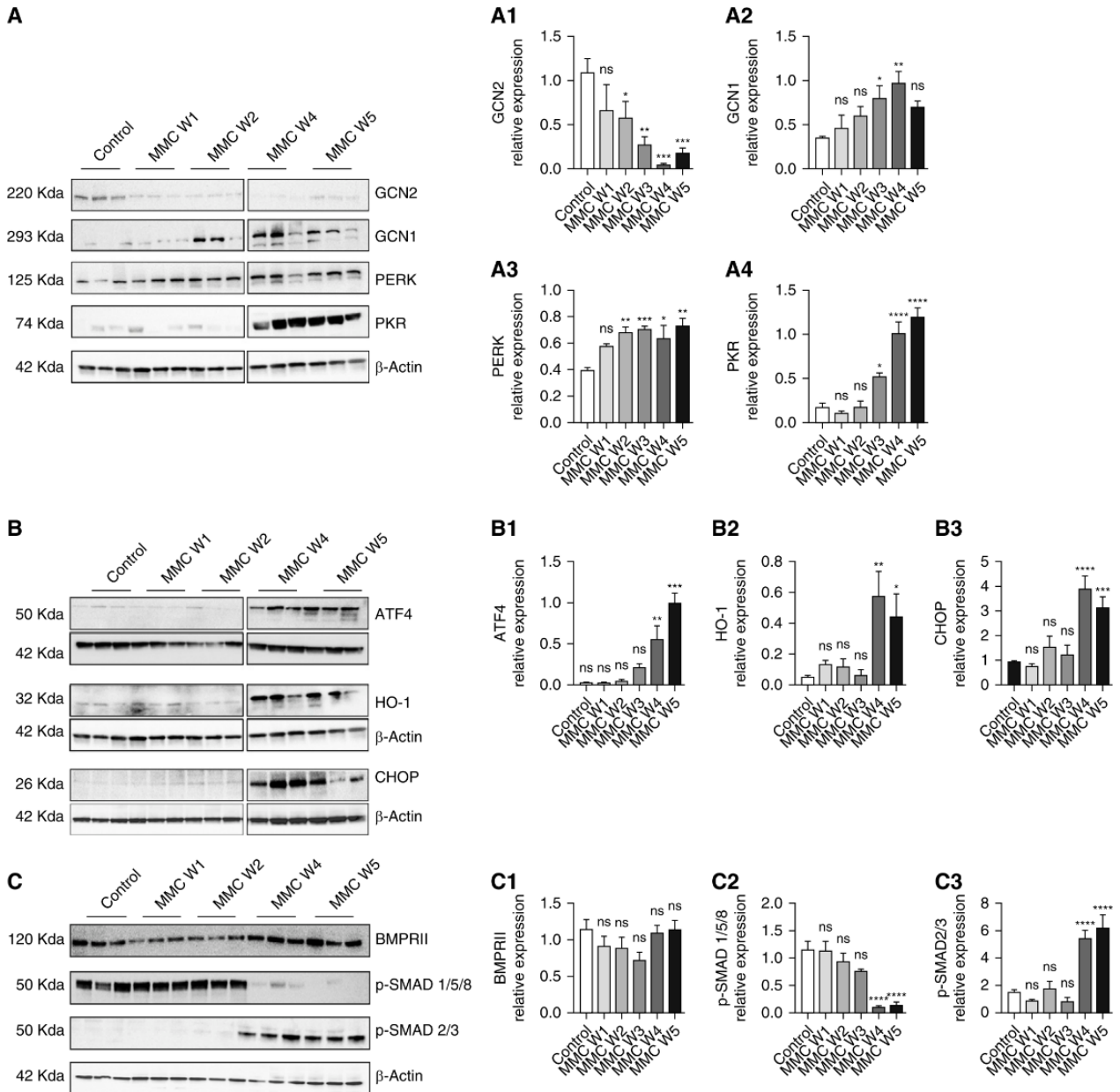
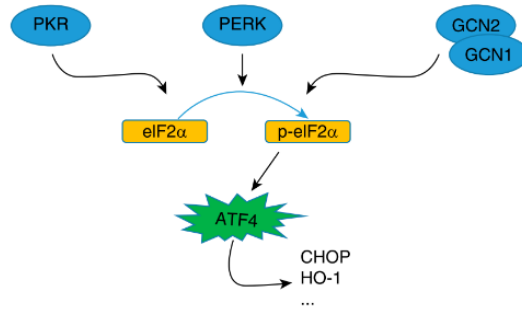


Figure 3. The integrated stress response (ISR) and SMAD phosphorylation are affected in lungs from MMC-exposed rats. (A) Pulmonary levels of GCN2 (A1), GCN1 (A2), PERK (A3), and PKR (A4) were analyzed by Western blotting during the development of pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) in control and MMC-exposed rats. (B) Pulmonary levels of ATF4 (activating transcription factor 4) (B1), HO-1 (heme oxygenase 1) (B2), and

marker CD45 protein at the same time points in MMC-PVOD rats. Significant pulmonary inflammation was also detected in sPVOD (Figure E7).

DOWNREGULATION OF KCNK3 CURRENT IN PULMONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS ISOLATED FROM MMC-EXPOSED RATS. Mutations in the *KCNK3* gene have been recognized as a new genetic cause of PAH (13). We recently demonstrated that loss *KCNK3* function is a hallmark of PAH (14) and that *Kcnk3* loss-of-function mutation in rats predisposes to the development of PH (15). *KCNK3* function was evaluated at two time points (W3 and W5 after MMC exposure and in controls) by whole-cell patch-clamp experiments on freshly isolated rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). The *KCNK3* current (I_{KCNK3}) was evaluated using the selective *KCNK3* blocker A293 (Figure 4A). At 200 nmol/L, A293 reduced the K^+ current by ~30–40% in control PASMCs (the A293-sensitive K^+ current represent the *KCNK3* current- I_{KCNK3}) (Figure 4A). At 3 and 5 weeks after MMC exposure, I_{KCNK3} was significantly reduced by 80% compared with control conditions (Figure 4B, left panel).

Moreover, the global K^+ current was reduced in PASMCs isolated from MMC-exposed rats by 50% (Figure 4B, middle panel) and the A293-insensitive K^+ current was reduced by 40% (Figure 4B, right panel), indicating that Voltage-gated K^+ currents were also significantly reduced in MMC-exposed rats.

LATE INCREASE IN PULMONARY SEROTONIN CONTENT. Serotonin, an old actor in PH pathogenesis, is considered to be a key driver of pulmonary arterial remodeling in PAH (16). However, in our PVOD model, pulmonary serotonin content was increased only at the very end of PVOD development (W5) (Figure E8), when PH and pulmonary vascular remodeling were already established, indicating that serotonin plays a role late in pathogenesis and/or serves as a marker of PH severity.

DOWNREGULATION OF THE ETS TRANSCRIPTION FACTOR ERG IN EXPERIMENTAL PVOD AND IN HUMAN PVOD. Lathen and colleagues demonstrated that the loss of ERG is crucial for endothelial homeostasis in pulmonary veins in mice (7). We showed that lung protein expression of ERG was lost 4 and 5 weeks after MMC exposure, when PH became symptomatic (Figure E9A) and drastically reduced in patients with hPVOD or sPVOD (Figure E9B).

Human Data

Upregulation of CHOP, HO-1, and p-SMAD2/3, and downregulation of p-SMAD1/5/9 in patients with hPVOD or sPVOD. We measured the protein expression of ISR kinases in lungs from patients with hPVOD and sPVOD, and patients without PVOD (Figures 5A and E10). We found that GCN2 expression was abolished in patients with hPVOD as compared with controls. We found a great heterogeneity for GCN2 expression in the sporadic forms of the disease, from total loss to nearly normal expression (Figures 5A and E10). It must reflect the very diverse etiologies of these idiopathic PVODs. Unlike MMC-PVOD, the lung expression of GCN1, PERK, and PKR was not significantly modified in patients with hPVOD or sPVOD compared with control subjects (Figure 5A). As observed in experimental PVOD, the phosphorylation status of eIF2 α was unchanged as compared with that in control subjects (Figure E1).

Regarding ISR kinase effectors, we found that ATF4 expression was unaffected in hPVOD and sPVOD (Figure 5B). However, the expression of downstream effectors CHOP and HO-1 was significantly increased in patients with hPVOD (twofold increase) and patients with sPVOD (3.6-fold increase) (Figure 5B), as we observed in rat MMC-PVOD.

We found that p-SMAD1/5/8 was significantly reduced in patients with

hPVOD (60% decrease), whereas BMPRII expression was unchanged (Figure 5C). Moreover, SMAD2/3 phosphorylation was higher in patients with sPVOD as compared with control subjects (threefold increase when expression was normalized to β -Actin, no significant difference when normalized to total SMAD2/3) (Figure 5C).

Specific CHOP and HO-1 expression in pulmonary vascular lesions of PVOD. Because we found an overexpression of HO-1 and CHOP, two important downstream effectors of GCN2 signaling, in both human and experimental PVOD, we decided to focus on those factors and localize the sites of their expression by immunohistochemistry. We assessed the PVOD specificity of CHOP and HO-1 expression by comparing their expression in PVOD, non-PH, and PAH samples.

We observed no convincing HO-1 or CHOP staining in control and PAH lung tissues (Figures E11–E13). However, we found that in both sPVOD (Figure E14) and hPVOD (Figure 6), CHOP staining labeled endothelial cells in remodeled veins and arteries, whereas the staining became faint in smooth muscle cells. Strong HO-1 staining was observed only within capillary hemangiomatosis foci (Figure 6). Outside of these foci, no staining was observed. The endothelial cells from arteries or veins did not express HO-1. Capillary hemangiomatosis foci stained strongly for the endothelial marker CD31 and displayed scant to high numbers of Ki67⁺ cells (Figures 6 and E14).

GCN2 loss of function negatively regulates BMP-dependent SMAD1/5/9 signaling, and exogenous BMP9 reverses GCN2 inhibition-induced proliferation of pulmonary artery endothelial cells. To confirm *in vivo* the possible link between loss of GCN2 and BMP signaling, we quantified GCN2 and SMAD1/5/9 phosphorylation by Western blot in the lungs of a newly created transgenic rat model knockout (KO) for *Eif2ak4* (Δ 152Ex1/ Δ 152Ex1) as compared with wild-type animals. We found a fourfold

Figure 3. (Continued). CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein [C/EBP] homologous protein) (B3) were analyzed by Western blotting during the development of PVOD in control and MMC-exposed rats. (C) BMPRII (C1), p-SMAD1/5/8 (C2), and p-SMAD2/3 (C3) were measured by Western blot analysis in control and MMC-exposed rats. Analyses were performed 1, 2, 4, and 5 weeks after MMC exposure (W3 is displayed in Figures E18 and E19). β -Actin was used as the loading control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, and **** $P < 0.0001$.

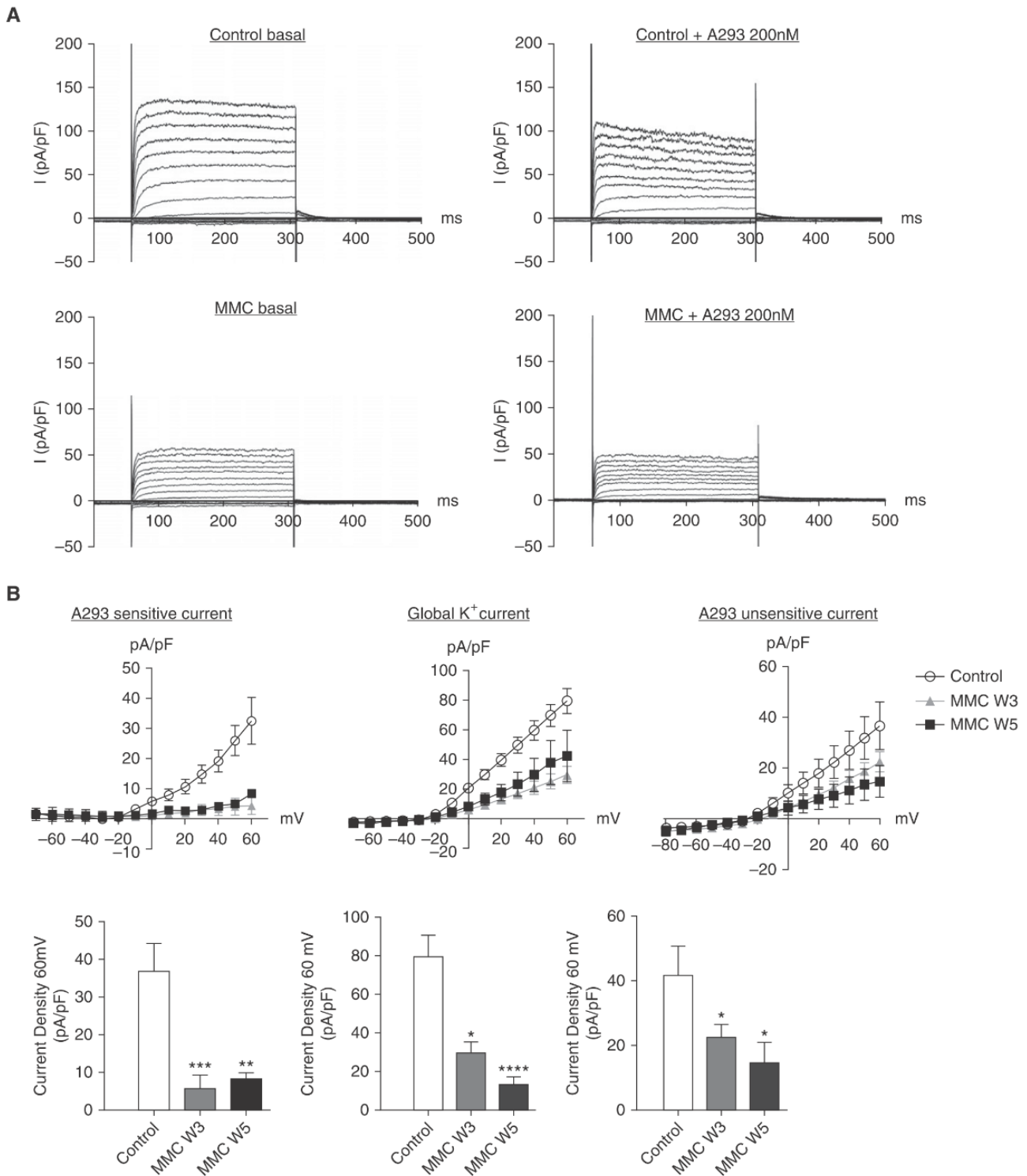


Figure 4. KCNK3 is functionally reduced in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) isolated from MMC-exposed rats. (A) Representative traces of the whole-cell currents in PASMCs in control (top, left traces) and MMC-exposed (5 wk) (bottom, left traces) rats before and after treatment with A293 (200 nM) (right traces). (B) Current–voltage relationship of the A293-sensitive K⁺ current (I_{KCNK3}) (top left panel), global K⁺ current (top middle panel), and A293-insensitive K⁺ current (top right panel) in PASMCs from control and MMC-exposed rats (3 and 5 wk after MMC exposure). Corresponding quantification of the A293-sensitive current, global K⁺ current, and A293-insensitive K⁺ current (three different rats, $n = 7\text{--}12$ cells) is shown. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, and **** $P < 0.0001$. pA/pF = picoamperes per picofarad.

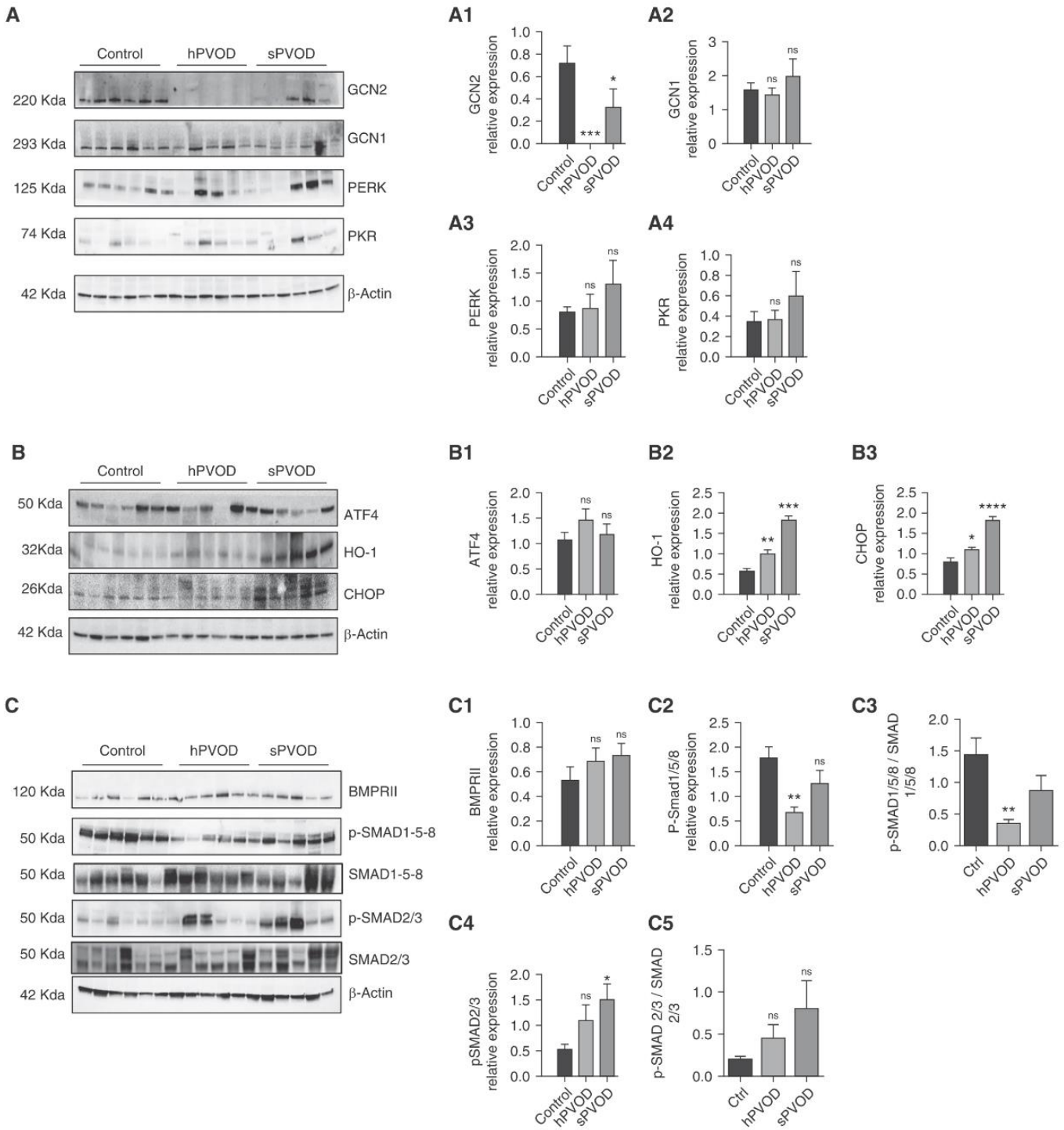


Figure 5. ISR and SMAD phosphorylation are affected in lungs from patients with heritable PVOD (hPVOD) or sporadic PVOD (sPVOD). (A) Pulmonary levels of GCN2 (A1), GCN1 (A2), PERK (A3), and PKR (A4) were analyzed by Western blotting in patients with hPVOD or sPVOD. β -Actin was used as the loading control. (B) Pulmonary levels of ATF4 (B1), HO-1 (B2), and CHOP (B3) were analyzed by Western blotting in patients with hPVOD or sPVOD. β -Actin was used as the loading control. (C) BMPRII (C1), p-SMAD1/5/8 (C2 and C3), and p-SMAD2/3 (C4 and C5) were measured by Western blot analysis in patients with hPVOD or sPVOD. β -Actin was used as the loading control in C1, C2, and C4; p-SMAD1/5/8 is normalized to SMAD1/5/8 in C3, and p-SMAD2/3 is normalized to SMAD2/3 in C5. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, and **** $P < 0.0001$. hPVOD samples originated from patients with nonsense/frameshift mutations in EIF2AK4 and therefore were expected to show a complete absence of GCN2 protein.

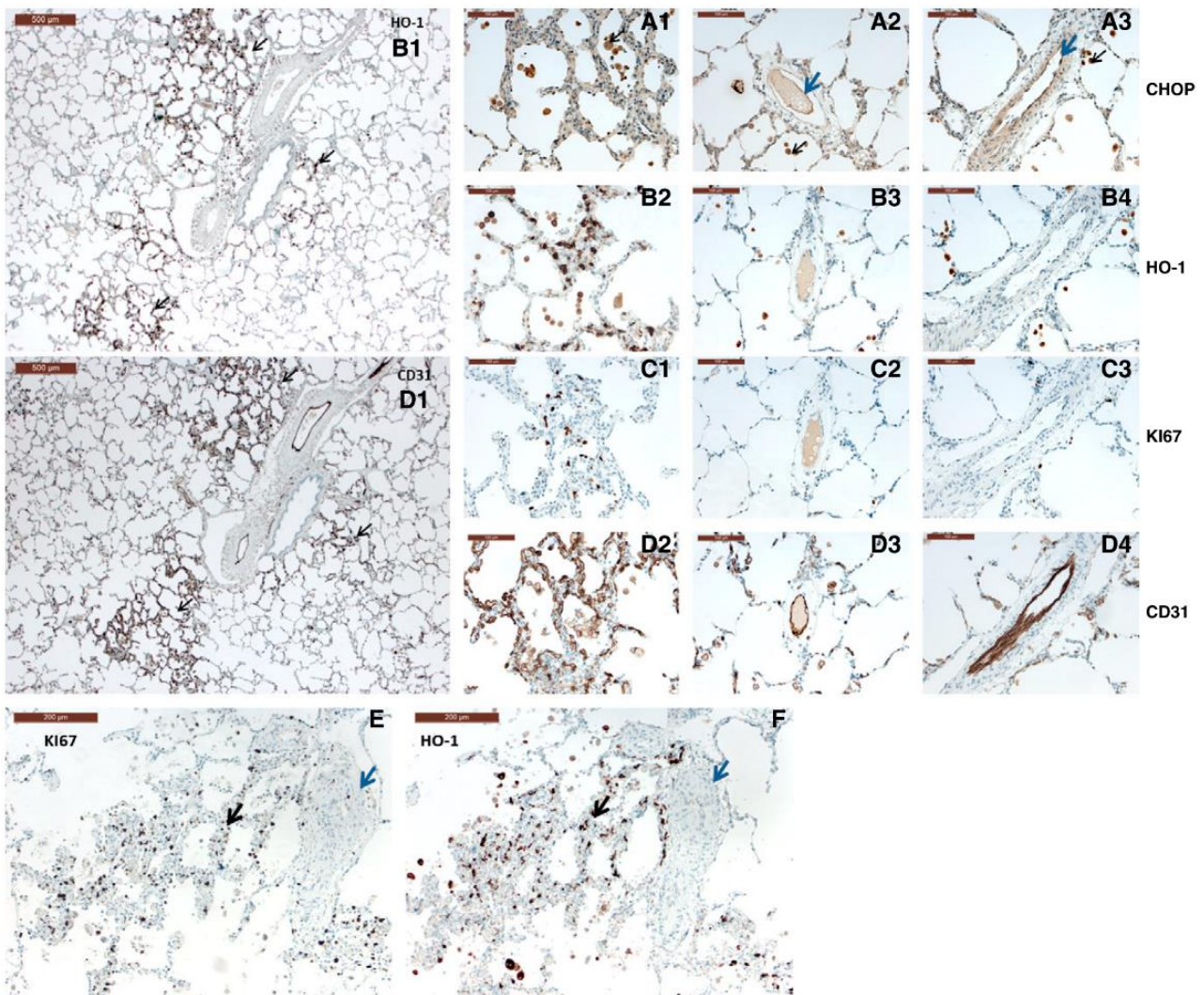


Figure 6. CHOP and HO-1 are expressed in typical pulmonary vascular lesions of hPVOD. (A) CHOP immunostaining in lungs from patients with hPVOD: endothelial staining is visible in both remodeled veins (A2, blue arrow) and arteries (A3, blue arrow). The staining becomes faint in smooth muscle cells, whereas it is well observed in the cytoplasm of bronchial cells, alveolar cells, and macrophages (A1–A3, black arrows). (B) HO-1 staining in PVOD lungs is observed in interstitial cells within alveolar septa in capillary hemangiomas foci (B1 and B2). The labeling is strong and highlights interstitial cells with cytoplasmic extensions. Outside of these foci, no staining is observed. Arterial and venous endothelial cells do not express HO-1 (B3 and B4). (C) Ki67 staining highlights cells engaged in proliferation. Scant interstitial cells are labeled within capillary hemangiomas foci and in the bronchial basal layer (C1). There is no significant Ki67 staining in end-stage remodeled arteries and veins (C2 and C3). (D) CD31 staining shows endothelial cells within alveolar septa (D1 and D2) and pulmonary vessels (D3 and D4). (E and F) Ki67 and HO-1 staining is focused within capillary hemangiomas foci (black arrows). A remodeled small pulmonary artery (blue arrows) does not display significant staining. Scale bars: 200 μm and 500 μm .

decrease in SMAD1/5/9 phosphorylation in KO rats (Figure 7A). Because those rats did not have increased pulmonary arterial pressure, as measured by right heart catheterization (data not shown), the decrease in SMAD1/5/9 phosphorylation in these rats was not the mere consequence of PH. It appears that in this “pure” background (same genetic background, same environment), loss of GCN2 robustly decreases SMAD1/5/9 phosphorylation.

Using a specific GCN2 inhibitor (2662034 compound) and a dual GCN2/PERK inhibitor (2712911 compound), we demonstrated that specific GCN2 inhibition preferentially decreases BMP9-induced SMAD1/5/8 phosphorylation in human pulmonary artery endothelial cells (PAECs) rather than in PSMCs (Figure 7B, E15A, and E15B). We confirmed the consequence of GCN2 invalidation in both cell types through a siRNA strategy. This strategy significantly

reduced complete medium (with FCS)-induced phosphorylation of SMAD1/5/8 in PAECs but not in PSMCs (Figure 7C and E15C). The loss of GCN2 strongly enhanced complete medium-induced PAEC proliferation (by twofold) (Figure 7D) but decreased the PSMC proliferation rate (Figure E15D). siRNA against GCN2 also increased expression of the antiapoptotic protein survivin in PAECs (Figure E16). In addition, the specific GCN2 inhibitor

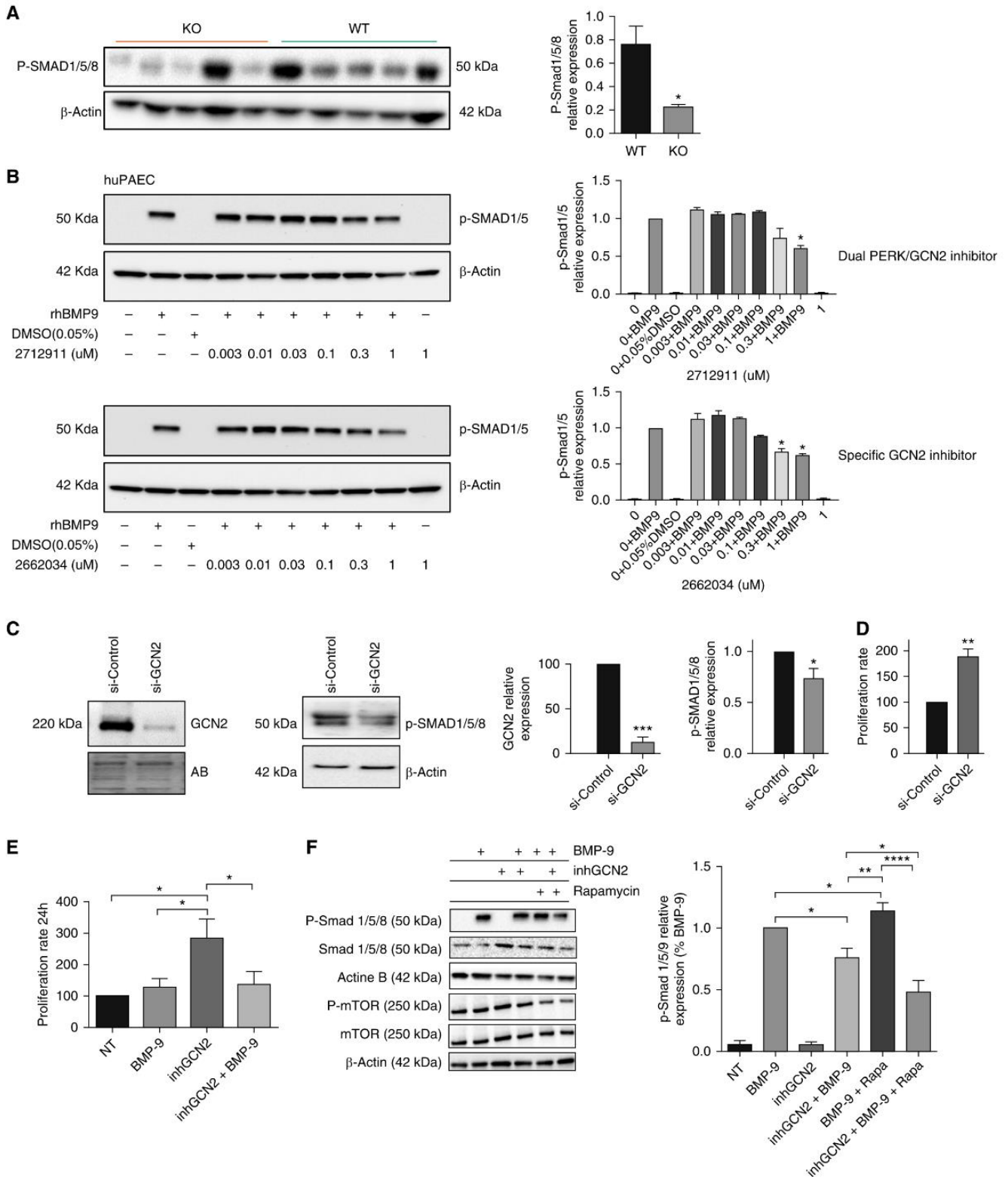


Figure 7. GCN2 loss of function negatively regulates SMAD1/5/9 phosphorylation, and exogenous BMP9 reverses GCN2 inhibition-induced proliferation of pulmonary artery endothelial cells (PAECs). (A) Pulmonary levels of p-SMAD1/5/8 analyzed by Western blot in wild-type (WT) and *Eif2ak4* knockout (KO) rats. β -Actin was used as the loading control. (B) Effect of GCN2 or PERK/GCN2 dual inhibitor on SMAD1/5/8 phosphorylation induced in human PAECs by rhBMP9 (20 ng/ml); 2712911 is a PERK/GCN2 dual inhibitor, and 2662034 is a specific GCN2 inhibitor. β -Actin was used as the loading control. Right

(2662034 compound) almost tripled complete medium-induced PAEC proliferation, an effect that was blunted by exogenous BMP9 treatment (Figure 7E), suggesting that the proliferative effects of GCN2 depend on its effects on BMPR2/SMAD.

Because GCN2 inhibits mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) in response to amino acid starvation (17), mTORC1 signaling negatively affects BMP signaling (18), and rapamycin (mTORC1 inhibitor) has been shown to potentiate BMP signaling (19), we hypothesized that GCN2 may increase SMAD signaling through downstream inhibition of mTORC1. As expected, the 2662034 compound decreased and rapamycin increased BMP9-induced SMAD1/5/9 phosphorylation. However, GCN2 inhibition with 2662034 compound strongly reduced BMP9+rapamycin-induced SMAD1/5/9 phosphorylation (Figure 7F). This led us to envision that GCN2 may be rather downstream of mTORC1.

Because mTORC1 is upstream of GCN2, we still could not explain the potentiating effect of GCN2 on BMPR2 signaling. To decipher the link between GCN2 and BMP signaling, we analyzed the effect of GCN2 activation by histidinol (0.5 mM) on the transcriptional expression of the genes involved in BMP signaling (human BMP signaling pathway; AnyGenes quantitative PCR array) in pulmonary endothelial cells. GCN2 activation was associated with an almost fivefold decrease in chordin expression (fold change [FC]: -4.76 ; $P=0.0065$) (Table E1).

We also wondered whether BMP signaling could also feed back on ISR signaling activation; therefore, we further investigated the effect of BMPR2 activation by BMP9 (20 ng/ml) on the transcriptional expression of the genes involved in ISR signaling (human ISR signaling pathway;

AnyGenes quantitative PCR array) in pulmonary endothelial cells. Our results suggest a negative feedback of BMP signaling to the ISR with downregulation of several genes involved in response to ER stress (BCL2L11, FC: -1.39 ; $P=0.0014$), the apoptotic process (PMAIP1, FC: -2.27 ; $P=0.0029$), regulation of translation (RPL7, FC: -1.82 ; $P=0.0029$), and autophagy (SQSTM1, FC: -2.00 ; $P=0.0193$) (Table E2).

Note: A transcriptional mechanism alters levels of total protein, with proportional changes in phospho-protein, whereas a post-translational mechanism leads to an increase or decrease in phosphorylation in the presence of steady-state protein level. Most of the phospho-proteins shown in this section were only normalized to β -Actin, which does not discriminate between transcriptional and post-translational mechanisms.

Discussion

Extensive pulmonary venous lesions and capillary remodeling are the hallmark of PVOD, whereas the pathology in PAH is classically described as constrictive remodeling of the precapillary pulmonary vasculature (20). However, our group recently reported significant remodeling in the pulmonary veins and venules of patients with heritable PAH (21). In addition, we recently highlighted that pulmonary arterial remodeling is also an important feature of PVOD (22). This last observation is in agreement with the early and massive arterial narrowing seen in our rat model of PVOD. The early reduction of pulmonary arterial patency, which may be initially caused by vasoconstriction, could rely on the observed loss of KCNK3 function that controls pulmonary arterial tone in humans (23).

MMC has been linked to PVOD, but also to cardiomyopathy. Coupled with the recent idea that pulmonary venous remodeling can be seen in PH secondary to left heart disease (24), we also had to confirm that the MMC model used here is truly representative of PVOD and not Group 2 PH. Indeed, in a previous study, MMC was associated with cardiotoxicity (25), with the most common cardiac event associated with MMC being chronic heart failure. However, almost all patients in that study who experienced a cardiac event had received prior doxorubicin therapy. This strongly suggests that MMC probably enhanced the cardiac damage incurred by prior doxorubicin therapy, thus exerting a synergistic cardiotoxic effect. MMC-related cardiac failure is not an acute event; rather, it exhibits a trend toward a cumulative dose effect and occurs weeks after multiple doses of MMC (25). In the series of MMC-induced PVOD in humans we described recently (8), all patients had undergone left cardiac evaluation by echocardiography with no finding of LV dysfunction, and none had received prior doxorubicin therapy. In addition, right heart catheterization showed normal pulmonary artery wedge pressure (≤ 15 mm Hg) in all patients, eliminating left cardiac involvement in the mechanism of PVOD occurrence. We carried out an echocardiographic follow-up of MMC-exposed rats and analyzed parameters that could inform us about potential alterations of LV function, such as LV fractional shortening. Pulmonary artery acceleration time (PAAT, a validated index of pulmonary vascular resistance, arterial pressure, and compliance) was also used to assess pulmonary hemodynamics at the same time points. Lower PAAT is indicative of pulmonary vascular disease (26, 27). Our observations suggest a rather limited and transient effect of MMC on the left heart, in contrast to the very early and constant decrease in PAAT (Figure E17),

Figure 7. (Continued). panels show quantification of the Western blots (left panels). (C) Human PAECs cultured in complete medium (with FCS) were transfected with siRNA against GCN2. GCN2 knockdown efficiency and SMAD1/5/8 phosphorylation were assessed by Western blots, with Amido Black (AB) and β -Actin stainings, respectively, used as loading controls. (D) Quantification of the consequences of siRNA-mediated silencing of GCN2 on PAEC proliferation as measured by bromodeoxyuridine incorporation. (E) Quantification of PAEC proliferation as measured by bromodeoxyuridine incorporation in serum-activated proliferating PAECs treated with BMP9 (20 ng/ml), a specific GCN2 inhibitor (2662034 compound, inhGCN2), or the combination BMP9+inhGCN2, or not treated (NT). (F) Quantification of p-SMAD1/5/8 levels analyzed by Western blot in basal medium-cultured PAECs treated with BMP9 (20 ng/ml), the specific GCN2 inhibitor (2662034 compound, inhGCN2), the combination BMP9+inhGCN2, the combination BMP9+rapamycin (Rapa, 10 ng/ml), or the combination BMP9+Rapa+inhGCN2, or not treated (NT). β -Actin was used as the loading control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, and **** $P < 0.0001$.

indicative of pulmonary vascular disease. Moreover, histologically confirmed venous remodeling occurred late in the development of our MMC-PVOD model, at a time when LV fractional shortening values returned to control values. This argues against LV dysfunction-induced pulmonary venous remodeling.

The imbalance of BMP/TGF- β signaling contributes to endothelial dysfunction, vascular remodeling, inflammation, and disordered angiogenesis in PAH (28). We wondered whether this axis could be altered in PVOD. Specific GCN2 inhibition with 2662034 compound or with siRNA reduced SMAD1/5/9 signaling but did not abrogate it in PAECs. Moreover, SMAD1/5/9 activation was decreased, but not abolished, in the lungs from *Eif2ak4*^{-/-} patients with PVOD and *Eif2ak4* KO rats. We showed that BMP9 was able to reverse GCN2 inhibition-induced PAEC proliferation, a pathway that could contribute to the characteristic foci of capillary hemangiomatosis, which is a highly typical histologic finding in PVOD. This supports the hypothesis that the proliferative effects of GCN2 depend on its effects on BMP9-dependent signaling (probably the canonical SMAD1/5/9 signaling pathway), but we did not investigate the other, noncanonical SMAD-independent signaling pathways p38, ERK, JNK (MAPK), PI3K/Akt, LIMK, Rho, ROCK, and TAK1 (29). Actually, many other gene modifiers regulate the BMPR2/SMAD1/5/9 axis (30, 31). Hence, there are many factors that can explain the heterogeneity of phospho-SMAD levels in human PVOD samples, especially those obtained from patients with sPVOD, such as different etiologies, different genetic backgrounds, differences in expression of gene modifiers, and different disease evolution. Moreover, the relation between GCN2 and SMAD1/5/9-dependent signaling is difficult to decipher, for several reasons. First, the roles of BMP9 in vascular homeostasis remain controversial and context dependent. On the one hand, it was reported that BMP9 induces proliferation and migration of endothelial cells by triggering the expression of VEGFR2 and TIE-2, both of which stimulate blood endothelial cell proliferation (32). On the other hand, BMP9 inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and

VEGF-stimulated angiogenesis when it signals through ALK1 (33). In our proliferation experiments, all of which were performed in complete medium (with FCS), BMP9 alone had no effect on PAEC proliferation, whereas it abolished GCN2 inhibition-induced PAEC overproliferation. This selectivity suggests that the proliferative effects of GCN2 depend on its effects on BMPR2/SMAD. Second, to confirm this dependence, interventional studies with knockdown of the receptors (BMPR2 and ALK1) or downstream BMP-regulated effectors may be envisioned. However, it should be noted that BMPR2 siRNA silencing results in a proliferative, promigratory PAEC phenotype (34) that may hide the upstream regulatory effect of GCN2 on this pathway. As a result of an interaction screen performed with the luminescence-based mammalian interactome mapping technique, GCN2 was found to directly interact with SMAD4 and SMAD1 (35), as well as with ALK-1, ENG (endoglin), and TGFBR2 (TGF- β receptor 2) (36). Further studies of the physical interactions that take place between GCN2 and members of the TGF- β /BMP superfamily, and the possibility of modulating them through site-directed mutagenesis of GCN2, may reveal a way to circumvent the aforementioned issues and dissect the interplay between GCN2 and BMP signaling.

Our results suggest that GCN2 may be downstream of mTORC1 in the regulation cascade that modulates SMAD1/5/9 phosphorylation, but further work is needed to dissect this regulatory axis. It has to be recognized that the two best-established responses to amino acid deprivation are inhibition of the mTOR kinase and phosphorylation of eIF2 α (37). Recent data showed that inhibition of mTORC1 leads to activation of GCN2 and phosphorylation of eIF2 α in a mechanism that depends on the PP6C phosphatase (37). This mechanism fits with and can explain our results showing that mTORC1 is a negative regulator of GCN2. *In vitro* activation of GCN2 with histidinol was associated with a dramatic decrease in chordin expression. Extracellular antagonists, such as chordin, are essential regulators of BMP signaling. Chordin binds to BMPs, blocking interaction with BMP receptors (38). Interventional studies are now required to confirm and investigate the role of

chordin in the GCN2-mediated BMP signaling potentiation. We also showed that BMP signaling activation with BMP9 can negatively feed back on ISR signaling activation, potentially dampening the deleterious effects of chronic ISR activation.

Two of the representative factors involved in the ISR—CHOP (39) and HO-1 (9)—were overexpressed in patients with sPVOD or hPVOD, as well as in experimental PVOD, suggesting that loss of GCN2 is associated with a paradoxical overexpression of its downstream effectors. Our immunohistochemical experiments support the specificity for CHOP and HO-1 involvement in PVOD pathobiology, with HO-1 appearing as a specific marker of capillary hemangiomatosis foci, which are pathognomonic lesions of PVOD and the place of intense microvascular endothelial cell proliferation. Relevant to this, an extensive study revealed a context-dependent effect of HO-1 activity in angiogenesis (40). HO-1 overexpression was shown to promote endothelial cell proliferation and enhance the development of endothelial tubules on Matrigel (41). In addition, HO-1-deficient mice were found to exhibit reduced endothelial proliferative responses to growth factors, attenuated tube formation, and impaired wound healing (42). These observations suggest that CHOP and/or HO-1 inhibition may be valuable targets for specific therapeutic development in PVOD. Because HO-1 is very often upregulated in tumors in comparison with healthy tissues, its inhibition (e.g., by metalloporphyrins) is under investigation as an anticancer treatment (43). The results of this research may be translated to therapeutic innovations for PAH. Inhibition of CHOP is hypothesized to enhance cell survival by preventing unfolded protein response-programmed cell death, but there are currently no known small-molecule CHOP inhibitors for either laboratory or clinical use. However, sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA), an ER stress inhibitor that is also considered as a CHOP inhibitor, has been demonstrated to alleviate monocrotaline-induced PH in rats (44). Monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid, causes VOD of the liver and pulmonary lesions in a dose-dependent manner, in a similar fashion as alkylating agents like MMC (45). This also highlights

the therapeutic potential of CHOP inhibition in PVOD.

The molecular hub for all ISR kinases, and GCN2 in particular, is eIF2 α , which is phosphorylated upon ISR activation (46). Surprisingly, the loss of GCN2 in human and experimental PVOD, or in PAECs and PASCs through siRNA knockdown (not shown), and the concomitant CHOP- and HO-1-mediated ISR are not associated with alterations in the phosphorylation status of eIF2 α . This suggests that a GCN2-dependent but eIF2 α -independent pathway could provide a bridge between these opposing observations. Although ATF4 induction without increased phosphorylation of eIF2 α is atypical for most ISRs, there are other examples of ISRs that can induce ATF4 or CHOP without increased phosphorylation of eIF2 α in macrophages, fibroblasts, and solid tumor cells (47–49). Indeed, ATF4 can also be induced without an increase in eIF2 α phosphorylation through the inhibition of eIF2B, a guanine nucleotide exchange factor (47–49). In hepatic cells, eIF2 α phosphorylation by dietary methionine restriction was found to be uncompromised in *Gcn2*^{-/-} mice. Instead, the ISR kinase PERK was activated in both intact and *Gcn2*^{-/-} mice (50). PERK activation corresponded with induction of the ISR and the NRF2 (nuclear respiratory factor 2) program. In addition, the PERK/NRF2 axis has been described to mediate the induction of

CHOP (51) and to upregulate HO-1 (52). The apparent mystery of the GCN2-dependent but eIF2 α -independent pathway occurring in PVOD that emanates from the results of our study will have to be investigated in future studies.

Finally, we showed that ERG protein expression was abolished in patients with hPVOD or sPVOD, as well as in MMC-exposed rats. ERG has been identified as a key modulator of endothelial cell differentiation (53) and hematopoiesis (54). Recently, ERG was demonstrated to be essential for endothelial homeostasis in pulmonary venules (7). Mice with homozygous deletion of ERG died prematurely due to the loss of pulmonary venules and the concomitant development of PVOD (7). ERG expression was also significantly reduced in chronically hypoxic mice and patients with PAH (55). Here, we found that ERG loss of expression is a hallmark of PVOD (both human forms and animal models of PVOD), an observation that suggests that ERG dysfunction may indeed be a central player in pulmonary vein remodeling.

Conclusions

Our study paints a picture of the histological and molecular alterations that occur in experimental and human PVOD. It paves the way for future studies aimed at understanding and curing this orphan disease. We demonstrated that MMC exposure is associated primarily with

arterial and microvessel remodeling and only secondarily by severe venous remodeling, suggesting that precapillary and capillary alterations may be initial events in PVOD. In all forms of PVOD tested, we observed convergent GCN2-dependent but eIF2 α -independent pulmonary protein overexpression of HO-1 and CHOP, two downstream effectors of GCN2 signaling and ER stress. In human PVOD samples, immunohistochemical staining supported the specificity for CHOP and HO-1 involvement in PVOD pathobiology, especially in pulmonary endothelial cells and pulmonary capillary hemangiomatosis foci. Our work shows that GCN2 loss of function negatively regulates SMAD1/5/9 phosphorylation. Despite this dampened BMP signaling, exogenous BMP9 was still able to reverse GCN2 inhibition-induced PAEC proliferation. Therefore, CHOP and HO-1 inhibition, and BMP9 may be considered as potential therapeutic options for PVOD.

NOTE ADDED IN PROOF

Although no change in phosphorylation of Eif2 α was detected, transient activation of the pathway might still be possible via minute changes in phosphorylation that cannot be detected by the methodology we employed. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

References

- Montani D, Lau EM, Dorfmueller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, et al. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J* 2016;47:1518–1534.
- Montani D, Girerd B, Jaïs X, Levy M, Amar D, Savale L, et al. Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary veno-occlusive disease: a population-based study. *Lancet Respir Med* 2017;5:125–134.
- Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2014;46:65–69.
- Montani D, Lau E, Descatha A, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease as an occupational lung disease. *Lancet Respir Med* 2017;5:e19.
- Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, et al. The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:10774–10779.
- Santos-Ribeiro D, Godinas L, Pilette C, Perros F. The integrated stress response system in cardiovascular disease. *Drug Discov Today* 2018; 23:920–929.
- Lathen C, Zhang Y, Chow J, Singh M, Lin G, Nigam V, et al. ERG-APLNR axis controls pulmonary venule endothelial proliferation in pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation* 2014;130:1179–1191.
- Perros F, Günther S, Ranchoux B, Godinas L, Antigny F, Chaumais M-C, et al. Mitomycin-induced pulmonary veno-occlusive disease: evidence from human disease and animal models. *Circulation* 2015;132:834–847.
- Dey S, Sayers CM, Verginadis II, Lehman SL, Cheng Y, Cerniglia GJ, et al. ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J Clin Invest* 2015;125:2592–2608.
- Ma L, Chung WK. The genetic basis of pulmonary arterial hypertension. *Hum Genet* 2014;133:471–479.
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002;12:9–18.
- Fabrice A, Benoît R, Valérie N, Lau E, Sébastien B, Frédéric P. A simple method to assess *in vivo* proliferation in lung vasculature with EdU: the case of MMC-induced PVOD in rat. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015; 2015:326385.
- Lambert M, Capuano V, Olschewski A, Sabourin J, Nagaraj C, Girerd B, et al. Ion channels in pulmonary hypertension: a therapeutic interest? *Int J Mol Sci* 2018;19:E3162.
- Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, et al. Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2016;133:1371–1385.
- Lambert M, Capuano V, Boet A, Tesson L, Bertero T, Nakhleh MK, et al. Characterization of *Kcnk3*-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ Res* 2019;125:678–695.

16. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006;113:1857–1864.
17. Yuan W, Guo S, Gao J, Zhong M, Yan G, Wu W, *et al.* General control nonderepressible 2 (GCN2) kinase inhibits target of rapamycin complex 1 in response to amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2017;292:2660–2669.
18. Deng Z, Lei X, Zhang X, Zhang H, Liu S, Chen Q, *et al.* mTOR signaling promotes stem cell activation via counterbalancing BMP-mediated suppression during hair regeneration. *J Mol Cell Biol* 2015;7:62–72.
19. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, *et al.* FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600–3613.
20. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, *et al.* Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(Suppl S):25S–32S.
21. Ghigna M-R, Guignabert C, Montani D, Girerd B, Jaïs X, Savale L, *et al.* BMPR2 mutation status influences bronchial vascular changes in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2016;48:1668–1681.
22. Nossent EJ, Antigny F, Montani D, Bogaard HJ, Ghigna MR, Lambert M, *et al.* Pulmonary vascular remodeling patterns and expression of general control nonderepressible 2 (GCN2) in pulmonary veno-occlusive disease. *J Heart Lung Transplant* 2018;37:647–655.
23. Olschewski A, Veale EL, Nagy BM, Nagaraj C, Kwapiszewska G, Antigny F, *et al.* TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur Respir J* 2017;50:1700754.
24. Fayyaz AU, Edwards WD, Maleszewski JJ, Konik EA, DuBroek HM, Borlaug BA, *et al.* Global pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension associated with heart failure and preserved or reduced ejection fraction. *Circulation* 2018;137:1796–1810.
25. Pai VB, Nahata MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 2000;22:263–302.
26. Naing P, Kuppusamy H, Scalia G, Hillis GS, Playford D. Non-invasive assessment of pulmonary vascular resistance in pulmonary hypertension: current knowledge and future direction. *Heart Lung Circ* 2017;26:323–330.
27. Levy PT, Patel MD, Choudhry S, Hamvas A, Singh GK. Evidence of echocardiographic markers of pulmonary vascular disease in asymptomatic infants born preterm at one year of age. *J Pediatr* 2018;197:48–56.e2.
28. Tielemans B, Delcroix M, Belge C, Quarck R. TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov Today* 2019;24:703–716.
29. Bach D-H, Park HJ, Lee SK. The dual role of bone morphogenetic proteins in cancer. *Mol Ther Oncolytics* 2017;8:1–13.
30. Dannewitz Prosseda S, Tian X, Kuramoto K, Boehm M, Sudheendra D, Miyagawa K, *et al.* FHIT, a novel modifier gene in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;199:83–98.
31. West J, Cogan J, Geraci M, Robinson L, Newman J, Phillips JA, *et al.* Gene expression in BMPR2 mutation carriers with and without evidence of pulmonary arterial hypertension suggests pathways relevant to disease penetrance. *BMC Med Genomics* 2008;1:45.
32. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, Watabe T. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci* 2010;123:1684–1692.
33. 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;120:964–972.
34. Awad KS, Elinoff JM, Wang S, Gairhe S, Ferreyra GA, Cai R, *et al.* Raf/ERK drives the proliferative and invasive phenotype of BMPR2-silenced pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016;310:L187–L201.
35. Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, *et al.* High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* 2005;307:1621–1625.
36. Xu G, Barrios-Rodiles M, Jerkic M, Turinsky AL, Nadon R, Vera S, *et al.* Novel protein interactions with endoglin and activin receptor-like kinase 1: potential role in vascular networks. *Mol Cell Proteomics* 2014;13:489–502.
37. Wengrod J, Wang D, Weiss S, Zhong H, Osman I, Gardner LB. Phosphorylation of eIF2 α triggered by mTORC1 inhibition and PP6C activation is required for autophagy and is aberrant in PP6C-mutated melanoma. *Sci Signal* 2015;8:ra27.
38. Troilo H, Zuk AV, Tunnicliffe RB, Wohl AP, Berry R, Collins RF, *et al.* Nanoscale structure of the BMP antagonist chordin supports cooperative BMP binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:13063–13068.
39. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep* 2016;17:1374–1395.
40. Kim Y-M, Pae H-O, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim N-H, *et al.* Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:137–167.
41. Deramaudt BM, Braunstein S, Remy P, Abraham NG. Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J Cell Biochem* 1998;68:121–127.
42. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, *et al.* Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:605–618.
43. Podkalicka P, Mucha O, Józkwicz A, Dulak J, Łoboda A. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets. *Contemp Oncol (Pozn)* 2018;22:23–32.
44. Wu Y, Adi D, Long M, Wang J, Liu F, Gai M-T, *et al.* 4-Phenylbutyric acid induces protection against pulmonary arterial hypertension in rats. *PLoS One* 2016;11:e0157538.
45. Günther S, Perros F, Rautou P-E, Girerd B, Ghigna M-R, Cazals-Hatem D, *et al.* Understanding the similarities and differences between hepatic and pulmonary veno-occlusive disease. *Am J Pathol* 2019;189:1159–1175.
46. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* 2002;110:1383–1388.
47. Wang X, Proud CG. A novel mechanism for the control of translation initiation by amino acids, mediated by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2B. *Mol Cell Biol* 2008;28:1429–1442.
48. Woo CW, Kutzler L, Kimball SR, Tabas I. Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B. *Nat Cell Biol* 2012;14:192–200.
49. Lehman SL, Ryeom S, Koumenis C. Signaling through alternative integrated stress response pathways compensates for GCN2 loss in a mouse model of soft tissue sarcoma. *Sci Rep* 2015;5:11781.
50. Wanders D, Stone KP, Forney LA, Cortez CC, Dille KN, Simon J, *et al.* Role of GCN2-independent signaling through a noncanonical PERK/NRF2 pathway in the physiological responses to dietary methionine restriction. *Diabetes* 2016;65:1499–1510.
51. Zong Z-H, Du Z-X, Li N, Li C, Zhang Q, Liu B-Q, *et al.* Implication of Nrf2 and ATF4 in differential induction of CHOP by proteasome inhibition in thyroid cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1395–1404.
52. Chen Y, Yuan T, Zhang H, Yan Y, Wang D, Fang L, *et al.* Activation of Nrf2 attenuates pulmonary vascular remodeling via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition: an insight from a plant polyphenol. *Int J Biol Sci* 2017;13:1067–1081.
53. Nikolova-Krstevski V, Yuan L, Le Bras A, Vijayaraj P, Kondo M, Gebauer I, *et al.* ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage. *BMC Dev Biol* 2009;9:72.
54. Loughran SJ, Kruse EA, Hacking DF, de Graaf CA, Hyland CD, Willson TA, *et al.* The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2008;9:810–819.
55. Looney AP, Han R, Stawski L, Marden G, Iwamoto M, Trojanowska M. Synergistic role of endothelial ERG and FL11 in mediating pulmonary vascular homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;57:121–131.

Online Supplemental Data

Comparison of Human and Experimental Pulmonary Veno-Occlusive Disease

Grégoire Manaud Msc, Esther J. Nossent MD, Mélanie Lambert PhD, Maria-Rosa Ghigna, Angèle Boët, MD, PhD, Maria-Candida Vinhas , Benoit Ranchoux PhD, Sébastien J. Dumas PharmD-PhD, Audrey Courboulin PhD, Barbara Girerd MD, PhD, Florent Soubrier MD-PhD, Juliette Bignard MSc, Olivier Claude PhD, Florence Lecerf Msc, Aurélie Hautefort PhD, Monica Florio PhD, Banghua Sun, Sophie Nadaud PhD, Stijn E. Verleden PhD, Séverine Remy PhD, Ignacio Anegón, MD, Harm Jan Bogaard MD-PhD, Olaf Mercier MD-PhD Elie Fadel MD-PhD, Gérald Simonneau MD-PhD, Anton Vonk Noordegraaf MD-PhD, Katrien Grünberg MD-PhD, Marc Humbert MD-PhD, David Montani MD-PhD, Peter Dorfmüller MD-PhD, Fabrice Antigny PhD, and Frédéric Perros PhD

Methods

Patients - We retrospectively reviewed clinical data and histological samples from 12 PVOD patients (6 with biallelic mutations in the *EIF2AK4* gene (hPVOD) and 6 non-carriers (sPVOD)) who were transplanted between 2004 and January 2015. Clinical diagnosis of PVOD had been established during interdisciplinary meetings with pulmonologists, radiologists and pathologists. Study patients were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a program approved by our institutional Ethics Committee, and had given written informed consent (Protocol N8CO-08-003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on June 18, 2008). Pulmonary arterial hypertension (PAH) samples used in immunohistochemistry (see hereafter) were originating from the same cohort.

For control patients, unused donor lungs were matched to the study cohort as close as possible using age and gender. These donor lungs were collected under existing Belgian law which releases the lungs for research if the quality is not sufficient for transplantation (Ethical number S59648 S61653 S61987). The methodology is explained before and in brief included air-inflation till 30cm of H2O and fixation at 10 Cm H2O in the fumes of liquid nitrogen and storage at -80°C. After CT scan (Siemens Somatom), lungs are sliced using a bandsaw in 2cm slices and systematically sampled using a core bore (1).

Clinical assessment - Patient demographics, pulmonary function testing and hemodynamics at diagnosis were obtained from the pulmonary hypertension database of the French Referral Center for Pulmonary Hypertension, Department of Pulmonology and Intensive Care Unit for Respiratory Diseases, Hôpital Bicêtre, AP-HP, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France.

In vivo study design - Rats were housed at the Faculty of Pharmacy of Châtenay-Malabry (ANIMEX platform, Châtenay Malabry, France). Animal studies were approved by the administrative panel on animal care at the Université Paris-Sud, Le Plessis-Robinson, France. The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N° B92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments CEEA26 CAP Sud. Rat experiments were supervised by Dr. Frédéric Perros (agreement delivered by the French Ministry of Agriculture for animal experiment N° A92-392). All efforts were made to minimize animal suffering.

Generation of *GCN2-deficient rats* – sgRNA was designed, produced and tested in vitro in rat C6 cells by T7 endonuclease I mismatch detection as previously described (2). The sgRNA targeted the following sequence: GGACTTCCAGGATCTGCGGC CGG. Zygote microinjection were performed as previously described (3). Briefly, zygotes were collected from pre-pubescent (4–5-wk-old) SD superovulated donor female rats (SD/Crl, Charles River, L'Arbresle, France) and then mated with fertile males. sgRNA (10ng/μl) and Cas9mRNA (50ng/μl) were co-microinjected into the cytoplasm of one-cell-stage fertilized embryos. Surviving embryos were implanted on the same day in the oviduct of pseudopregnant females (0.5 dpc). Newborn rats were genotyped using microcapillary electrophoresis as previously described (4). Our strategy was to induce a reading frame shift in the first exon of *Eif2ak4* in order to disrupt the gene. We developed a strain with a biallelic deletion of 152 bp in the first exon of *Eif2ak4* ($\Delta 152\text{Ex1}/\Delta 152\text{Ex1}$).

All animal care and procedures performed in this study were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Pays de la Loire region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Number: Apafis 692). All efforts were made to minimize suffering. The rats were housed in a controlled environment (temperature $21\pm 1^\circ\text{C}$, 12-h light/dark cycle).

Rat Genotyping - After genomic DNA extraction from rats' ear punches, PCR were performed using 5X Herculase and primers (DNA bases: UPTE71-EIF2AK4: 5'-GAGGTCCCGTTTTTCAGAGC-3' and LoTE71-EIF2AK4: 5'-AAGTCGAGGTGGGGAAGAAT-3') encompassed mutant sequences. The PCR product were loaded on 1.5% agarose gels and stained with SYBR Safe (Invitrogen; cat. no. S33102). The amplicon size is 619 pb for wild-type allele and 467 pb for $\Delta 152\text{Ex1}$ allele.

Mitomycin C-induced PVOD-model - To evaluate the kinetics of PH development after MMC exposure, female Wistar rats (5 weeks old, Janvier Labs, Saint Berthevin, France) received two regimens of MMC as previously described (5) (3 mitomycin-C Kyowa $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{wk}^{-1}$ once a week for 2 weeks, IP). Rats were randomly assigned to a control group (n=5) or MMC exposed groups (n=30). Rats were sacrificed at week 1 (n=5), week 2 (n=5), week 3 (n=5), week 4 (n=5) and week 5 (n=5). To

minimize suffering, necropsy order at each time point was determined by the clinical condition of individual animals.

Evaluation of right ventricle hypertrophy and collection of tissue - Rats were anesthetized with isoflurane (2L/min O₂/3% isoflurane; Minerve, Esternay, France). Following exsanguination, the hilum of the left lung was ligated and the right lung was distended by infusion of formalin via the trachea, and then embedded in paraffin. The non-inflated left lungs were snap frozen in liquid nitrogen and used for protein and RNA quantification. For Fulton's index of right ventricle hypertrophy (RVH), the ratio of the right ventricular weight to left ventricular plus septal weight (RV/LV+S) was calculated.

Echocardiographic measurement – To rule out the possibility that MMC-induced LV dysfunction participates in the pulmonary venous and arteriolar alterations seen with mitomycin, we carried over an Trans-thoracic echocardiography (TTE) follow-up of MMC-exposed rat (3 mg MMC/kg i.p. at day 0 and day 7) and analyzed parameters that could inform us about potential alterations of left ventricle (LV) function: calculated aortic cardiac output (CO), LV fractional shortening (LVFS), LV End Systolic Diameter (LVESD), LV End Diastolic Diameter (LVEDD) and Interventricular septum thickness at end-diastole (IVSd), at day 0 (before MMC exposure), then day 2, 8, 10, 17, 22 and 28 post first MMC exposure. Pulmonary artery acceleration time (PAAT), a validated index of pulmonary vascular resistance, arterial pressure, and compliance, was used to assess pulmonary hemodynamics at the same time points. Lower PAAT is indicative of pulmonary vascular disease (6) (7). Evaluation by TTE was performed with a digital ultrasound system (Vivid E9, GE Healthcare) by using a high-frequency phased array transducer (12 S-D 4-12MHz, GE Healthcare). Echocardiographic evaluation procedure was performed under general anesthesia and spontaneous breathing with an Isoflurane Rodent Anesthesia 21 System (Minerve, Esternay, France) (maintenance: isoflurane 2% at room air). Rats were shaved and body temperature was controlled during experiments. All analyses were performed in a blinded fashion way: rats' experimental conditions were unknown by the operator during TTE examination and data interpretation. All measurement were performed as previously described (8).

Histopathology - Lung samples from all rats were retrospectively analyzed in a blinded fashion by conventional light microscopy using quantitative semi-automated software (NIS-BR, Nikon, Champigny sur Marne, France). Of each rat at each time point 5-micrometer thick sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) or hematoxylin-eosin-saffron (HES) and Trichrome/Weigert staining (cytoplasm/smooth muscle cells in red, fibrin/erythrocytes in magenta, collagen/fibrosis in blue, elastic fibres in black and nuclei in brown/black). Additional α -smooth-muscle actin (α -SMA) immunohistochemical (IHC) stains were performed.

Quantifying remodeling pulmonary arteries and veins – All pulmonary vessels were topographically recognized: pulmonary arteries were always accompanied by an adjacent airway; pulmonary veins were identified within interlobular septa, or in pre-septal position. Also, when septa were not visible due to sectional hazard, vessels between to transversally sectioned and clearly identified PAs were identified as pulmonary veins. Vessels beneath $<70\ \mu\text{m}$ in diameter are referred to as microvessels, since their pre- or post-capillary origin cannot be clearly determined. The surface of the lumen, intima, media and adventitia of 5 concentric pulmonary arteries (Trichrome/Weigert staining) of each rat was measured, as was the lumen and total wall thickness of 5 veins (diameter between 70 and 250 μm) (α -SMA, IHC). The ratio between the surface of the lumen and total vessel wall was calculated.

Quantifying remodeling of microvessels - Microvessels (arterioles and venules) were counted in 10 fields (objective 20x) on 1 paraffin slide (α -SMA, IHC) of each rat. The degree of remodeling was assessed semi-quantitatively: not remodeled (α -SMA negative), mildly remodeled (α -SMA positive but without loss of the lumen), moderate remodeled (α -SMA positive with loss of the lumen $\leq 50\%$) and severely remodeled (α -SMA positive with loss of the lumen $>50\%$).

Immunohistochemistry - Paraffin-embedded 5 μm thick sections of lung samples were mounted on SuperFrostPlus slides (Thermoscientific, Villebon sur Yvette, France). The immunostainings using CHOP (rabbit polyclonal, reference number: HPA058416, Sigma-Aldrich), HO-1 (rabbit polyclonal, reference number: HPA000635, Sigma-Aldrich), CD31 (EP78, rabbit monoclonal), Ki67 (SP6, rabbit monoclonal) antibodies were performed according the facility automated protocol (benchmark GX

autostainer, Ventana Medical System, Roche). Positive and negative controls of HO-1 and CHOP stainings were used to validate the specificity of the primary antibodies (Figure E20).

Western blots - Rat lung tissue samples were prepared as described (9). 80 μ g of protein were separated on SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. After blocking, membranes were incubated in T-TBS and 5% nonfat milk overnight at 4°C with primary antibodies described in the Table E1. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:10000 (Cell Signaling) or with HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:5000 (Cell Signaling), respectively. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin Elmer). Image-J Software was used to quantify the level of protein expression.

Electrophysiological recordings - Hearts and lungs were rapidly excised into ice-cold physiological Ca^{2+} -free Hank's media. First- to third-order intrapulmonary arteries, with diameters between 2 and 0.2 mm, were dissected, the endothelium of vessels was disrupted by rubbing the luminal surface with a cotton swab, the fibroblast-containing adventitial layer was removed, and the media containing PASMC was dissociated with a cocktail containing papain, DTT, and BSA, as previously described (10). K^+ currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique at room temperature (22–24°C) in normoxic conditions, with an Axopatch 200B amplifier, a Digidata 1440A, and pClamp 10 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Borosilicate glass pipettes (Harvard Apparatus) were pulled with a Sutter puller, fired polished, and had a resistance of 3–5 M Ω . The pipette solution contained (in mM): 130 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 1 EGTA, at pH 7.2 (adjusted with KOH). The bath solution contained (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 0.5 NaH₂PO₄, 0.5 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucose, at pH 7.4 (adjusted with NaOH). Cell capacitances (9–15 pF for PASMC and 4–5 pF for PAEC) were obtained for each cell measured, and the current was normalized to the cell's capacitance.

I_{KV} was elicited by applying a 400-ms voltage step to 0 mV, from a holding potential of –40 mV. I_{KCNK3} current was elicited by addition of specific KCNK3 blocker, A293 compound (provided by Sanofi). I_{KCNK3} correspond to the A293 sensitive current. To minimize any nonspecific effects, we used A293 at

200 $\mu\text{mol/L}$ (10, 11). The junction potential of ~ 4.6 mV between the pipette and bath solution was corrected off-line.

Determination of pulmonary serotonin levels using Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

1. Preparation of standards

Stock solutions of serotonin (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and serotonin-D4 used as internal standards (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande, France) were prepared at a concentration of 10mg/ml in distilled water. They were then diluted as working solutions in ammonium formate 100mM (buffered with formic acid at pH=3.5) at concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ and 3 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The internal standard was included in the sample before extraction.

2. Sample preparation for LC-MS/MS

The extraction solution was composed of 10% ammonium formate 100 mM pH 3.5, 10% serotonin-D4 solution 3 $\mu\text{g/ml}$ and 80% acetonitrile allowing metabolite extraction and protein precipitation. Pieces of frozen lungs from rats were weighed (about 50mg) and homogenized into 1ml of extraction solution using GentleMACS™ dissociator (Miltenyi Biotech, Paris, France). The homogenates were then centrifuged at 1500g for 5 min at 4°C in order to discard macroscopic residues. The supernatants were collected and submitted to two successive centrifugations at 15000g for 10 min at 4°C to further eliminate small residues. Supernatants were collected after each centrifugation to achieve a clear solution and then stored at -20°C until use.

3. LC-MS/MS

10 μL each standard (serotonin and serotonin-D4 solutions) and extracts were injected in a HPLC instrument Ultimate 3000 DGP3600 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) with an automatic injector WPS 3000 set at 4°C. Separation of metabolites was performed using a Nucleoshell® HILIC column (100mmx2mm, 2.7 μm , Macherey-Nagel, Hoerd, France). The mobile phase composed of acetonitrile/100mM ammonium formate (pH=3.5): 80/20 (V/V), was used at a flow rate of 400 $\mu\text{L/min}$.

The run time was 4,5min for each sample. The retention time was 1 min for both serotonin and serotonin-D4.

Detection of serotonin was achieved with a triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, Massachusetts, USA) using an electrospray ionization source. The source and desolvation gas temperatures were set to 120°C and 350°C respectively. Desolvation gas flow was set to 479L/h, capillary and cone voltages to 2,5kV and 35V respectively. Multiple reaction monitoring (MRM) was used in positive mode to detect precursor ions of serotonin at m/z 177 and serotonin-D4 at m/z 181. Applying collision energies of 10eV and 11eV, product ions were obtained at m/z 160 and 164 for serotonin and serotonin-D4 respectively.

4. Semi-quantitative analysis

Peaks of serotonin and internal standard serotonin-D4 were integrated and the variability of extraction rates was corrected calculating the ratio between peak areas of serotonin and serotonin-D4. Then, these ratios were divided by the weight of lung pieces.

Effect of GCN2 and PERK/GCN2 dual inhibitor on BMP-9 signaling in huPAEC and huPASMC cells

Experiments displayed on Figure 7B, E15A and E15B were performed in Amgen Laboratories (Dr Monica Florio and Dr Banghua Sun) following the above protocols:

Cells and Reagents

Human pulmonary artery endothelial cells (huPAEC), human pulmonary artery smooth muscle cells (huPASMC) and culture medium were obtained from Lonza Bioscience (Walkersville, MD). Antibodies for phospho-SMAD1/5 was from Cell Signaling (Cat# 13820S); Phospho-PERK was from BioLegend (Cat# 6494) and β -Actin was from Sigma (Cat# A3854). Compound 2712991 and 2662034 were from Amgen compound bank. Recombinant human BMP9 was from R&D Systems (Cat# 3209-BP-010/CF).

Cell Treatment

huPAEC and huPASC cells were cultured on 6-well plates at 1×10^6 cells/ml in 2ml culture medium for 24 hours. Cells were typically about 70% confluent at the time of treatments. Cells were exposed to 0.003–1 μ M GCN2 inhibitory compounds or 0.05%DMSO in basal medium (without serum and any supplements) for 3 hours, followed by adding BMP9 at 20ng/ml for 30 minutes.

p-Smad1/5 and p-PERK Detection

Treated huPAEC and huPASC were harvested on ice in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged. Cell lysates were made by adding an appropriate volume of lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.05% SDS, 50 mM NaF, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaVO₄, protease inhibitor cocktail; Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and vortexed for 2 seconds. After centrifugation at 4°C, the supernatant was removed and the protein concentration determined (BCA protein assay reagent; Pierce, Rockford, IL). An equal amount of total protein of each sample was resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Invitrogen). Blots were blocked for 2 hours in PBST (PBS plus 0.1% Tween-20) containing 5% milk (blocking buffer) before incubation with primary antibodies. For p-Smad1/5 and p-PERK detection, blots were incubated with primary antibodies at 1:1,000 and 2 μ g/ml separately for 2 hours at room temperature. After three washes with PBST, blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling, Cat# 7074S). Blots were developed using SuperSignal Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Cat# 34080). To detect β -Actin on the same blots, the blots were stripped with Western blot stripping buffer (Pierce) for 15 minutes with shaking. Blots were blocked for 1 hour, followed by incubation with β -Actin antibody (1 hour) and secondary antibody (1 hour) and developed. Western blot signal was detected using Bio-Red ChemiDoc MP Image System.

Experiments displayed on Figure 7C, 7D, 7 E, E15C, E15D, E16 and E21 were performed at Inserm U999 following the above protocols:

Human PAEC culture

Human PAECs were cultured as previously described (12) and were used for the study between passages 3 and 5. Patients studied were part of a program approved by our institutional Ethics Committee and had given written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006). Single and co-treatment of PAECs were made in 60mm dishes in 3ml of MCDB131 media (Gibco). At 70-80% of confluence, cells were treated with GCN2 inhibitory compound (2662034) at 1 μ M (Amgen), Rapamycin at 10 ng/ml (Sigma-Aldrich) in basal media (Serum and supplements free) for 4h, followed by adding BMP-9 (R&D Biosystems) for 30' at 20 ng/ml (13). We used rapamycin at 10 ng/ml, as previously described to potentiate BMP signaling in endothelial cells (14).

PAECs were treated with 0.5 mM of His during 4 hours because it induced a robust activating phosphorylation of GCN2 (Thr 899) as compared to other time points (10 and 24 hours) and other doses (0.05, 1, 2 and 5 mM) (Figure E21A) of the revised manuscript). At 0.5 mM His, 2662034 compound was also able to almost completely abrogate GCN2 phosphorylation whereas it couldn't at higher dose (1 mM) Figure E21B).

Human qPCR Array

Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to standard procedures. RNA quantity and quality was assessed using the Nanodrop-ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 205311). Gene expression of BMP pathway (Ref PZ36A1H1) and ISR pathway (ISR1H1) were determined using SignArray96, (Reference numbers: ISR1H1 and PZ36A1H1, Anygenes, and Paris, France) on a StepOne + Real-Time PCR System (Life Technologies). Briefly, each qPCR reaction contains 10 μ l of PMS, 2 μ l of Validated qPCR Primer Sets (Reverse + Forward, 10 μ M each; AnyGenes, Paris, France), 4 μ l of diluted cDNA and 4 μ l nuclease-free water for a final volume of 20 μ l. PCR amplification was conducted following cycling conditions : pre-incubation at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, and 1 s at 72 °C. The mRNA expression for each gene was normalized using the housekeeping gene transcripts of actin beta (ACTB).

All the primer sets and associated fold change and p-value are described in the supplementary table E2 (BMP pathway) and E3 (ISR pathway).

Statistical Analyses –

All data were checked for normal distributions. Quantitative variables are presented as means \pm standard errors of the means (SEMs). Data were analyzed using Student's t-tests or one-way analysis of variance and Bonferroni multiple comparisons tests. P values less than 0.05 were considered to reflect statistical significance.

References

1. Verleden SE, Vasilescu DM, Willems S, Ruttens D, Vos R, Vandermeulen E, Hostens J, McDonough JE, Verbeken EK, Verschakelen J, Van Raemdonck DE, Rondelet B, Knoop C, Decramer M, Cooper J, Hogg JC, Verleden GM, Vanaudenaerde BM. The site and nature of airway obstruction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:292–300.
2. Jung CJ, Ménoret S, Brusselle L, Tesson L, Usal C, Chenouard V, Remy S, Ouisse L-H, Poirier N, Vanhove B, de Jong PJ, Anegon I. Comparative Analysis of piggyBac, CRISPR/Cas9 and TALEN Mediated BAC Transgenesis in the Zygote for the Generation of Humanized SIRPA Rats. *Sci Rep* 2016;6:31455.
3. Ménoret S, De Cian A, Tesson L, Remy S, Usal C, Boulé J-B, Boix C, Fontanière S, Crénéguy A, Nguyen TH, Brusselle L, Thinard R, Gauguier D, Concordet J-P, Cherifi Y, Fraichard A, Giovannangeli C, Anegon I. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci Rep* 2015;5:14410.
4. Chenouard V, Brusselle L, Heslan J-M, Remy S, Ménoret S, Usal C, Ouisse L-H, NGuyen TH, Anegon I, Tesson L. A Rapid and Cost-Effective Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* 2016;43:341–348.
5. Perros F, Günther S, Ranchoux B, Godinas L, Antigny F, Chaumais M-C, Dorfmueller P, Hautefort A, Raymond N, Savale L, Jaïs X, Girerd B, Cottin V, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation* 2015;132:834–847.
6. Levy PT, Patel MD, Choudhry S, Hamvas A, Singh GK. Evidence of Echocardiographic Markers of Pulmonary Vascular Disease in Asymptomatic Infants Born Preterm at One Year of Age. *J Pediatr* 2018;197:48-56.e2.

7. Naing P, Kuppusamy H, Scalia G, Hillis GS, Playford D. Non-Invasive Assessment of Pulmonary Vascular Resistance in Pulmonary Hypertension: Current Knowledge and Future Direction. *Heart Lung Circ* 2017;26:323–330.
8. Lambert M, Boet A, Rucker-Martin C, Mendes-Ferreira P, Capuano V, Hatem S, Adão R, Brás-Silva C, Hautefort A, Michel J-B, Dorfmueller P, Fadel E, Kotsimbos T, Price L, Jourdon P, Montani D, Humbert M, Perros F, Antigny F. Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2018;114:880–893.
9. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais M-C, Dorfmueller P, Antigny F, Dumas SJ, Raymond N, Lau E, Savale L, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G, Stenmark K, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Montani D, Perros F. Chemotherapy-induced pulmonary hypertension: role of alkylating agents. *Am J Pathol* 2015;185:356–371.
10. Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, Pécoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay E, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmueller P, Breuils-Bonnet S, Fadel E, Ranchoux B, Jourdon P, Girerd B, Montani D, Provencher S, Bonnet S, Simonneau G, Humbert M, Perros F. Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2016;133:1371–1385.
11. Putzke C, Wemhöner K, Sachse FB, Rinné S, Schlichthörl G, Li XT, Jaé L, Eckhardt I, Wischmeyer E, Wulf H, Preisig-Müller R, Daut J, Decher N. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 2007;75:59–68.
12. Dumas SJ, Bru-Mercier G, Courboulain A, Quatre-deniers M, Rucker-Martin C, Antigny F, Nakhleh MK, Ranchoux B, Gouadon E, Vinhas M-C, Vocelle M, Raymond N, Dorfmueller P, Fadel E, Perros F, Humbert M, Cohen-Kaminsky S. NMDA-Type Glutamate Receptor Activation Promotes Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2018;137:2371–2389.
13. Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Gräf S, Machado RD, Mueller M, Kinzel B, Yung LM, Wilkinson JM, Moore SD, Drake KM, Aldred MA, Yu PB, Upton PD, Morrell NW. Selective

enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 2015;21:777–785.

14. Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghighat R, Chan R, Haghighat L, de Jesus Perez V, Wang L, Reddy S, Zhao M, Bernstein D, Solow-Cordero DE, Beachy PA, Wandless TJ, Ten Dijke P, Rabinovitch M. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2013;123:3600–3613.
15. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:161–167.
16. Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2007;46:20–32.

Supplemental legends

Figure E1: Analysis of p-eiF2 α in lung from hPVOD, sPVOD patients and MMC-exposed rats.

A, p-eiF2 α expression measured by Western blot analysis in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure). **B**, p-eiF2 α in lung from hPVOD and spVOD. β -Actin was used as loading control ns = non-significant.

Figure E2: Upregulation of mitogenic and anti-apoptotic pathways in MMC-exposed rats:

Pulmonary levels of P-P38, p-ERK1/2, PCNA and Survivin in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. *P<0.05, **P<0.005, ***P<0.0005, ****P<0.0001

Figure E3: MMC induces progressive development of foci of alveolar wall thickening suggestive of pulmonary capillary hemangiomatosis in rats.

HE stained paraffin embedded lung sections in control and MMC-exposed rats (1, 2, 3, 4 and 5 weeks after MMC-exposure) with foci of alveolar wall thickening (arrows) suggestive of pulmonary capillary hemangiomatosis developing overtime and becoming manifest at week 3 and progressive at week 4 and 5.

Figure E4: Analysis of protein Twist-1 expression in MMC-exposed rats.

Twist1 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. Quantification of the Western blots are shown close to Western blots image *P<0.05; ***P<0.0005.

Figure E5: Analysis of protein p120-catenin expression in lung from sPVOD, hPVOD patients and in MMC-exposed rats.

Pulmonary levels of p120-catenin was analyzed by Western blotting during the development of PVOD in control and MMC exposed-rats (A) (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19) and in Human (B). β -Actin was used as loading control. Quantification of Western blots is shown near Western blot image. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0005$.

Figure E6: Apoptosis is enhanced in MMC-induced PVOD.

Pulmonary levels of cleaved-Caspase 3 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. Right panel represent the quantification of the Western blots. ** $P < 0.005$. *** $P < 0.0005$.

Figure E7: Inflammation is enhanced in lung from hPVOD, sPVOD patients and in MMC-induced PVOD.

Pulmonary levels of CD45 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (A) (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19) and in lung from hPVOD and sPVOD (B). β -Actin was used as loading control. Right panel represent the quantification of the Western blots. * $P < 0.05$.

Figure E8: Dysregulation of serotonin pathway in MMC-induced PVOD.

Pulmonary serotonin (5-HT) content was significantly increased at week 5. *** $P < 0.0005$.

Figure E9: Analysis of ERG expression in lung from hPVOD, sPVOD patients and MMC-exposed rats. A, ERG expression measured by Western blot analysis in control and MMC-exposed rats (1, 2, 3, 4 and 5 weeks after MMC-exposure). **B,** ERG in lung from hPVOD and sPVOD. β -Actin was used as loading control * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$.

Figure 10: Additional analysis of GCN2 expression in lung from hPVOD, sPVOD patients

A, GCN2 lung expression measured by Western blot analysis in sPVOD patients. **B**, GCN2 lung expression hPVOD. β -Actin was used as loading control.

hPVOD samples are originating from patients with nonsense/frameshift mutations in *EIF2AK4*.

Figure E11: Analysis of Ki67, HO-1 and CHOP expression in control lung patients.

Lung tissue control. No KI67 staining within the alveolar septa (A). HO-1 (B) and CHOP (C) are not expressed in lung control.

Figure E12: Analysis of HO-1 expression in PAH lung patients

HO-1 staining in lungs with pulmonary arterial hypertension. Pulmonary arteries (A, C) and pulmonary veins (B, D) do not express HO-1 staining is not found in lung explants of PAH patients.

Figure E13: Analysis of CHOP expression in PAH lung patients

DDIT3 (CHOP) staining in lungs with pulmonary arterial hypertension. Pulmonary arteries do not express DDIT3, while in plexiform lesion a very faint staining become visible within the endothelial cells (B). No staining is observed in small muscular arteries (C). A very faint staining is observed in endothelial cells of small veins (D).

Figure E14: Analysis of Ki67, HO-1 and CD31 expression in sPVOD lung patients

PVOD without EIF2AK4 mutation. DDIT3 (CHOP) staining in PVOD lung; endothelial staining is visible in both remodeled veins (1B, blue arrow) and arteries (1C, blue arrow). The staining becomes faint in smooth muscle cells whereas it is well observed in cytoplasm of bronchial cells, alveolar cells and macrophages (1A, 1B, 1C black arrows). HO-1 staining in PVOD lungs is observed in interstitial cells within alveolar septa in capillary hemangiomatosis foci (2A). The labelling is strong and highlights interstitial cells with cytoplasmic extensions. Outside these foci no staining is observed. The endothelial cells do not express HMOX. Ki67 staining highlights cells engaged in proliferation. Scant interstitial

cells are labelled within capillary hemangiomas foci and in bronchial basal layer. CD31 staining underlines endothelial cells within alveolar septa (4A) and of pulmonary vessels (4B, 4C).

Figure E15: Effect of GCN2 and PERK/GCN2 dual inhibitor on BMP-9 signaling in huPASMC cells.

2712991 is PERK/GCN2 dual inhibitor, 2662034 is GCN2 inhibitor.

A, Effect of PERK/GCN2 dual inhibitor on BMP-9 signaling and PERK phosphorylation level in huPASMC. **B**, Effect of specific GCN2 inhibitor on BMP-9 signaling and PERK phosphorylation in huPASMC. **C**, Effect of siGCN2 on p-SMAD 1/5/8 phosphorylation in huPASMC. **D**, Effect of siGCN2 on PASMC proliferation. β -Actin (A, B) and Amido Black (C) was used as loading control. Right panels represent the quantification of the Western blots (Left panels). *P<0.05.

Figure E16: Knockdown of GCN2 in human pulmonary endothelial cells increases survivin expression.

Consequence of GCN2 knockdown on Survivin expression in human PAEC (n=4)

Figure E17: Effect of MMC on cardiac function in rats

Echocardiographic measurement of MMC exposed and control rats (J0, J2, J8, J10, J17, J22 and J28) of Weight (A), PAAT (B), Aortic Cardiac Output (C), Normalized Cardiac Output (D), LV Fractional Shortening (E), LV ESD (F), LV EDD (G) and IVDS (H).

Strikingly, PAAT was significantly lower in MMC exposed-rats as compared to controls, as soon as day 2 after the first MMC injection and remained lower for the whole follow-up. This was followed by a lower CO from day 8 to day 28. If normalized to the body weight, decreased CO was transient from day 8 to day 22. Interestingly, LVFS decreased following the same kinetic. Decreased LVFS was mainly attributable to lower LVEDD. IVSD was unchanged for the whole follow up indicating the absence of LV hypertrophy.

It has been shown that the use of echocardiography for assessment of cardiac anatomy, function, and hemodynamics can be consistently applied to the rat and replicates much of the information used routinely in human echocardiography. In this context, the LVFS are similar to those reported for healthy human beings (15). LVFS>25% being the normal range, the LVFS values while decreased in MMC-exposed rat are not pathologic. Decreased CO could be linked to LV function alteration but can equally be attributed to right ventricular dysfunction. Moreover, toxicities of chemotherapy like MMC can result in clinically significant diarrhea leading to hypovolemia, another relevant trigger of low CO. At last, cardiotoxicity of chemotherapy like doxorubicin are associated to dilated cardiomyopathy (16) that doesn't fit with the lower LVEDD we measured in MMC exposed rat.

Figure E18: Pulmonary levels of p-P38, p-ERK1/2, PCNA, Survivin, GCN-1, PERK, HO-1, PKR, ATF4, CHOP, p-SMAD2/3 and Survivin in MMC-exposed rats.

A, Pulmonary levels of p-P38, p-ERK1/2, PCNA and Survivin expression in controls and MMC exposed rats (week 1, 2, 4 and 5). B Pulmonary levels of GCN1, PERK, HO-1, PKR, ATF4, CHOP, p-SMAD2/3 and Survivin in control and 3 weeks after MMC-exposure in rats. β -Actin was used as loading control. *P<0.05 **P<0.005 ***P<0.0005 ****P<0.0001.

Figure E19: Pulmonary levels of P-120-Catenin, p-SMAD1/5/8, Twist 1, P-P38, p-ERK1/2, cleaved Caspase 3, BMPRII, CD45, PCNA, GCN2 and p-eiF2 α three weeks after MMC-exposure. A, Pulmonary levels of P-120-Catenin, p-SMAD1/5/8, Twist 1, P-P38, p-ERK1/2, cleaved Caspase 3, BMPRII, CD45, PCNA, GCN2 and p-eiF2 α in control and 3 weeks after MMC-exposure in rats. β -Actin was used as loading control. *P<0.05.

Figure E20: Positive and negative controls of HO-1 and CHOP in human lung patients.

HO-1 positive and negative controls. HO-1 is expressed in membranes and cytoplasm of clear cells renal carcinoma (1A). The negative control has been performed on the same tissue by withdrawing the primary antibody (1B). HO-1 is not expressed in colorectal carcinoma [(1C) negative control]. DDIT3 (CHOP) staining appears strong within the cytoplasm of neoplastic cells (mediastinal seminoma (2A)).

Endothelial staining is visible in tumor associated vessels (arrow). Negative control has been assessed on the same tissue by primary antibody withdrawal. No staining is found in colorectal cancer tissue, we used as additional negative control (2C).

Figure E21: Determination of the histidinol concentration in in vitro experiments.

Human PAEC levels of **A**, p-GCN2 (Thr 899) and GCN2 were analyzed by Western Blotting after treatment with several doses of Histidinol (0.05 mM, 0.5 mM and 1 mM) at several times (4h, 10h and 24h). β -Actin was used as loading control. **B**, p-GCN2 (Thr 899) and GCN2 were analyzed by Western Blotting after treatment with Histidinol 0.5 mM and 1 mM alone and co-treated with the GCN2 inhibitor 1 μ M (2662034) (left panel) with the quantification data (right panel).

Table E1: Characteristics of primary antibodies used for Western blot experiments.

Target	Host specie	Clone	Supplier	Reference	Concentration
GCN2	Rabbit	-	Cell Signaling	3302	1/1000
p-GCN2 (T899)	Rabbit	EPR2320Y	Abcam	ab75836	1/1000
ATF4	Rabbit	QC0913	Sigma-Aldrich	SAB2108090	1/1000
CHOP	Mouse	L63F7	Cell Signaling	2895	1/1000
p-eiF2α (Ser51)	Rabbit	-	Cell Signaling	9721	1/1000
BMPRII	Mouse	3F6	ThermoScientific	MA5-15827	1/1000
p-SMAD 1 (Ser463/465)/5 (Ser463/465)/8 (Ser465/467)	Rabbit	D5B10	Cell Signaling	13820	1/1000
SMAD 1/5/8	Rabbit	-	Abcam	ab80255	1/1000
p-SMAD2 (Ser465/467) /3 (Ser423/425)	Rabbit	D27F4	Cell Signaling	8828	1/1000
SMAD 2/3	Rabbit	-	Cell Signalling	3102	1/1000
TWIST1	Mouse	12A3	Santa Cruz Biotechnology	sc-81417	1/1000
p120-Catenin / Delta 1 Catenin	Mouse	6H11	Abcam	ab11508	1/10000
Cleaved Caspase 3	Rabbit	5A1E	Cell Signaling	9604	1/1000
CD45	Mouse	69/CD45	BD Transduction Laboratories	610266	1/1000
p-P38 (Thr180/Tyr182)	Rabbit	-	Cell Signaling	9211	1/1000
p-ERK1(Thr202)/2 (Thr204)	Rabbit	-	Cell Signaling	9101	1/1000
PCNA	Mouse	PC10	Dako	M0879	1/500
β-Actin	Mouse	AC-74	Sigma-Aldrich	A5316	1/10000
GCN1	Rabbit	-	Abcam	ab86139	1/5000
PERK	Rabbit	C33E10	Cell Signaling	3192	1/1000
p-PERK (Ser713)	Rabbit	Poly6494	BioLegend	649401	1/1000
PKR	Rabbit	-	Abcam	ab187883	1/1000
HO-1	Rabbit	-	Abcam	ab13243	1/2000
Survivin	Rabbit	71G4B7	Cell Signaling	2808	1/1000
ERG	Rabbit	EPR3864	Abcam	ab92513	1/1000
p-mTOR (Ser2448)	Rabbit	D9C2	Cell Signaling	5536	1/1000
mTOR	Rabbit	-	Cell Signaling	2972	1/1000
CD31	Rabbit	EP78	Sigma-Aldrich	131R-2	1/200

E21

Table E2: Effect of histidinol treatment on the transcriptional activity related to the BMP signaling pathway in PECs

Human BMP Signaling Pathway							Ref: PZ36A1H1			
Gene name	RefSeq	Symbol	sub-pathways	Ch. Location	Forward Primer location	Reverse Primer location	Amplicon size (bp)	Fold Change	p-value	
activin A receptor like type 1	NM_000020.2	ACVRL1	Activin receptor signaling pathway	12q13.13	exon 8	exon 9	121	4,04	0,3768	
activin A receptor type 1B	NM_020328.3	ACVR1B	Activin receptor signaling pathway	12q13.13	exon 3	exon 4	141	1,49	0,5542	
activin A receptor type 1C	NM_145259.2	ACVR1C	Activin receptor signaling pathway	2q24.1	exon 8	exon 9	134	14,71	0,369	
activin A receptor type 2A	NM_001278579.1	ACVR2A	Activin receptor signaling pathway	2q22.3-q23.1	exon 11	exon 12	137	27,58	0,3643	
activin A receptor type 2B	NM_001106.3	ACVR2B	Activin receptor signaling pathway	3p22.2	exon 9	exon 10	148	1,82	0,5445	
folliculin	NM_006350.3	FST	Activin receptor signaling pathway	5q11.2	exon 1		128	13,84	0,1645	
SMAD family member 3	NM_005902.3	SMAD3	Activin receptor signaling pathway	15q21-q22	Junction 6-7	exon 7	111	1,50	0,5177	
transforming growth factor beta receptor 1	NM_004612.2	TGFBRI	Activin receptor signaling pathway	9q22	exon 4	exon 5	150	7,47	0,3902	
cAMP-dependent protein kinase inhibitor alpha	NM_006823.4	PKIA	cAMP-mediated signaling	8q21.13	exon 3	Junction 3-4	97	14,00	0,3703	
folliculin like 1	NM_007085.4	FSTL1	Cellular protein metabolism	3q13.33	exon 8	exon 9	78	3,90	0,3984	
ornithine decarboxylase antizyme 1	NM_004152.2	OAZ1	Cellular protein metabolism	19p13.3	exon 5	exon 6	93	2,53	0,3458	
activin A receptor type 1	NM_001105.4	ACVR1	Cellular response to BMP stimulus	2q23-q24	exon 3	exon 4	130	2,34	0,4239	
runt related transcription factor 2	NM_001024630.3	RUNX2	Cellular response to BMP stimulus	6p21	exon 4	exon 5	109	1,98	0,5209	
SMAD family member 9	NM_001127217.2	SMAD9	Cellular response to BMP stimulus	13q13.3	exon 5	exon 6	149	1,23	0,7756	
transmembrane protein 100	NM_001099640.1	TMEM100	Cellular response to BMP stimulus	17q23.1	exon 4	exon 4	131	17,41	0,283	
growth factor receptor bound protein 2	NM_002086.4	GRB2	MAPK Signaling	17q24-q25	exon 6	exon 6	78	2,51	0,3463	
Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	NM_002228.3	JUN	MAPK Signaling	1p32-p31	exon 1	exon 1	99	-1,14	0,809	
mitogen-activated protein kinase kinase 1	NM_002755.3	MAP2K1	MAPK Signaling	15q22.1-q22.33	exon 3	exon 4	99	4,07	0,3747	
mitogen-activated protein kinase kinase 2	NM_030662.3	MAP2K2	MAPK Signaling	19p13.3	exon 3	exon 4	141	-1,09	0,8342	
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	NM_145331.1	MAP3K7	MAPK Signaling	MAP3K7	exon 2	exon 3	91	7,20	0,3816	
mitogen-activated protein kinase 1	NM_002745.4	MAPK1	MAPK Signaling	22q11.2	exon 1	exon 2	168	2,71	0,3343	
mitogen-activated protein kinase 14	NM_001315.2	MAPK14	MAPK Signaling	6p21.3-p21.2	exon 1	exon 2	150	2,13	0,497	
mitogen-activated protein kinase 3	NM_002746.2	MAPK3	MAPK Signaling	16p11.2	Junction 4-5	exon 5	108	-1,79	0,0968	
mitogen-activated protein kinase 8	NM_139049.1	MAPK8	MAPK Signaling	10q11	exon 9	exon 10	92	14,03	0,3773	
Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	NM_002880.3	RAF1	MAPK Signaling	3p25	exon 2	exon 3	73	-2,70	0,0139	
SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1	NM_005633.3	SOS1	MAPK Signaling	2p21	exon 20	Junction 20-21	129	1,41	0,6112	
TGF-beta activated kinase 1 (MAP3K7) binding protein 1	NM_006116.2	TAB1	MAPK Signaling	22q13.1	exon 1	exon 2	77	1,66	0,4387	
caveolin 1	NM_001753.4	CAV1	Negative regulation of BMP signaling pathway	7q31	exon 2	exon 3	106	7,64	0,3496	

E22

chordin	NM_003741.3	CHRD	Negative regulation of BMP signaling pathway	3q27.1	exon 11	exon 12	94	-4,76	0,0065
chordin like 1	NM_001143981.1	CHRD1	Negative regulation of BMP signaling pathway	Xq23	exon 3	exon 4	137	2,10	0,4995
folliculin like 3	NM_005860.2	FSTL3	Negative regulation of BMP signaling pathway	19p13.3	exon 4	exon 4	96	2,25	0,4592
gremlin 1, DAN family BMP antagonist	NM_013372.6	GREM1	Negative regulation of BMP signaling pathway	15q13.3	exon 2	exon 2	132	1,12	0,8067
homeodomain interacting protein kinase 2	NM_022740.4	HIPK2	Negative regulation of BMP signaling pathway	7q32-q34	exon 6	exon 7	106	3,97	0,3909
LDL receptor related protein 2	NM_004525.2	LRP2	Negative regulation of BMP signaling pathway	2q31.1	exon 34	exon 35	126	-1,38	0,4681
NBL1, DAN family BMP antagonist	NM_182744.3	NBL1	Negative regulation of BMP signaling pathway	1p36.13	exon 3	exon 4	142	1,35	0,6612
noggin	NM_005450.4	NOG	Negative regulation of BMP signaling pathway	17q22	exon 1	exon 1	115	-1,06	0,8985
SKI proto-oncogene	NM_003036.3	SKI	Negative regulation of BMP signaling pathway	1p36.33	exon 4	exon 5	83	-1,41	0,236
SMAD family member 6	NM_005585.4	SMAD6	Negative regulation of BMP signaling pathway	15q22.31	exon 2	exon 3	104	7,21	0,3978
SMAD family member 7	NM_005904.3	SMAD7	Negative regulation of BMP signaling pathway	18q21.1	exon 4	exon 4	144	4,51	0,3697
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	NM_020429.2	SMURF1	Negative regulation of BMP signaling pathway	7q22.1	exon 18	exon 19	86	2,90	0,2766
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	NM_022739.3	SMURF2	Negative regulation of BMP signaling pathway	17q23.3-q24.1	exon 18	exon 19	78	53,43	0,3654
sclerostin domain containing 1	NM_015464.3	SOSTDC1	Negative regulation of BMP signaling pathway	7p21.2	exon 1	exon 2	101	1,00	0,9944
transducer of ERBB2, 1	NM_005749.4	TOB1	Negative regulation of BMP signaling pathway	17q21.33	exon 2	exon 2	140	8,68	0,2854
eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	NM_004095.3	EIF4EBP1	Negative regulation of translational initiation	8p11.23	exon 1	exon 2	70	1,85	0,2618
eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	NM_004096.4	EIF4EBP2	Negative regulation of translational initiation	10q22.1	exon 1	exon 2	110	3,67	0,4453
eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 3	NM_003732.3	EIF4EBP3	Negative regulation of translational initiation	8p11.23	exon 1	exon 2	88	1,34	0,6775
endoglin	NM_001114753.1	ENG	Positive regulation of BMP signaling pathway	9q33-q34.1	exon 3	exon 4	110	2,03	0,3112
F-box and leucine rich repeat protein 15	NM_024326.3	FBXL15	Positive regulation of BMP signaling pathway	10q24.32	exon 3	exon 3	68	1,17	0,8097
forkhead box D1	NM_004472.3	FOXD1	Positive regulation of BMP signaling pathway	5q13.2	exon 1	exon 1	121	2,98	0,2593
hes family bHLH transcription factor 5	NM_001010926.3	HESS5	Positive regulation of BMP signaling pathway	1p36.32	exon 2	exon 2	62	1,84	0,5854
notch receptor 1	NM_017617.3	NOTCH1	Positive regulation of BMP signaling pathway	9q34.3	exon 10	exon 11	80	-1,45	0,1963
nuclear mitotic apparatus protein 1	NM_006185.3	NUMA1	Positive regulation of BMP signaling pathway	11q13.4	exon 8	exon 9	130	1,66	0,415
SMAD family member 2	NM_005901.4	SMAD2	Positive regulation of BMP signaling pathway	18q21	exon 8	exon 9	149	14,35	0,3521
SMAD family member 4	NM_005359.5	SMAD4	Positive regulation of BMP signaling pathway	18q21.1	exon 9	exon 10	146	7,88	0,3346
SRY-box 11	NM_003108.4	SOX11	Positive regulation of BMP signaling pathway	2p25.2	exon 1	exon 1	112	1,44	0,5257
ubiquitin conjugating enzyme E2 O	NM_022066.4	UBE2O	Positive regulation of BMP signaling pathway	17q25.1	exon 15	exon 16	135	1,32	0,6745
zinc finger protein 423	NM_015069.4	ZNF423	Positive regulation of BMP signaling pathway	16q12.1	exon 7	Junction 7-8	130	4,22	0,3582
anti-Mullerian hormone	NM_000479.4	AMH	Positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	19p13.3	exon 4	exon 5	139	3,11	0,4831
nuclear factor kappa B subunit 1	NM_003998.3	NFKB1	Positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	4q24	exon 7	exon 7	67	2,06	0,2904
ubiquitin conjugating enzyme E2 D1	NM_003338.5	UBE2D1	Protein ubiquitination	10q21.1	exon 4	exon 5	147	107,95	0,3686
ubiquitin conjugating enzyme E2 D3	NM_003340.5	UBE2D3	Protein ubiquitination	4q24	exon 6	exon 7	102	14,43	0,3553

E23

family with sequence similarity 83 member G	NM_001039999.3	FAM83G	Regulation of BMP signaling pathway	17p11.2	exon 4	exon 5	132	-1,25	0,6253
gremlin 2, DAN family BMP antagonist	NM_022469.4	GREM2	Regulation of BMP signaling pathway	1q43	exon 2	exon 2	135	3,35	0,4134
integrin subunit alpha 3	NM_002204.3	ITGA3	Regulation of BMP signaling pathway	17q21.33	exon 4	exon 5	136	1,16	0,8385
secreted frizzled related protein 4	NM_003014.4	SFRP4	Regulation of BMP signaling pathway	7p14.1	exon 1	exon 2	147	4,84	0,2909
solute carrier family 39 member 5	NM_173596.3	SLC39A5	Regulation of BMP signaling pathway	12q13.3	exon 8	exon 9	100	3,58	0,4675
transcription factor AP-2 beta	NM_003221.4	TFAP2B	Regulation of BMP signaling pathway	6p12.3	exon 5	exon 6	129	3,47	0,4736
X-linked inhibitor of apoptosis	NM_001167.3	XIAP	Regulation of BMP signaling pathway	Xq25	exon 3	exon 4	138	14,69	0,3583
LIM domain kinase 1	NM_002314.3	LIMK1	Signal transduction	7q11.23	exon 9	exon 10	85	-1,08	0,8005
solute carrier family 33 member 1	NM_004733	SLC33A1	Signal transduction	3q25.31	exon 5	exon 6	100	14,28	0,3526
SMAD family member 1	NM_005900.2	SMAD1	Signal transduction	4q31	Junction 4-5	exon 5	150	1,48	0,5489
SMAD family member 5	NM_001001419.2	SMAD5	Signal transduction	5q31	exon 3	exon 4	149	7,66	0,3646
signal transducer and activator of transcription 3	NM_139276.2	STAT3	Signal transduction	17q21	exon 19	exon 20	112	1,92	0,3542
activating transcription factor 2	NM_001880.3	ATF2	Transcription	2q32	exon 8	exon 8	93	7,39	0,3738
calcium/calmodulin dependent protein kinase IV	NM_001744.6	CAMK4	Transcription	5q22.1	exon 5	exon 6	103	7,63	0,3904
cAMP responsive element binding protein 1	NM_134442.3	CREB1	Transcription	2q34	exon 2	exon 3	147	7,86	0,3503
CREB binding protein	NM_004380.2	CREBBP	Transcription	16p13.3	exon 3	exon 4	88	2,94	0,2627
homeobox C9	NM_006897.2	HOCX9	Transcription	12q13.13	exon 1	exon 1	135	5,15	0,3116
MAGE family member D1	NM_001005333.1	MAGED1	Transcription	Xp11.22	exon 12	exon 13	133	3,61	0,138
NK2 homeobox 5	NM_004387.3	NKX2-5	Transcription	5q35.1	exon 2	exon 2	104	5,40	0,2387
paired like homeodomain 2	NM_000325.5	PITX2	Transcription	4q25	exon 3	exon 3	126	3,25	0,4368
scleraxis bHLH transcription factor	NM_001080514.3	SCX	Transcription	8q24.3	exon 1	exon 2	79	1,89	0,3759
T cell leukemia homeobox 2	NM_016170.5	TLX2	Transcription	2p13.1	exon 1	exon 1	69	6,43	0,4232
transducer of ERBB2, 2	NM_016272.4	TOR2	Transcription	22q13.2	exon 2	exon 2	113	-1,27	0,609
anti-Mullerian hormone receptor type 2	NM_020547.3	AMHR2	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	12q13.13	exon 11	exon 11	97	1,40	0,5759
forkhead box H1	NM_003923.2	FOXH1	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	8q24.3	exon 2	exon 2	86	-1,52	0,4048
ubiquitin specific peptidase 15	NM_001252078.2	USP15	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	12q14.1	exon 1	exon 2	148	27,86	0,3628
ubiquitin specific peptidase 9 X-linked	NM_001039590.2	USP9X	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	Xp11.4	exon 9	exon 10	95	8,58	0,3669
ubiquitin specific peptidase 9 Y-linked	NM_004654.3	USP9Y	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway	Yq11.221	exon 26	exon 27	136	1,68	0,4104
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_021130	PPIA	House-keeping genes	7p13	exon 1	exon 2	97		
actin, beta	NM_001101	ACTB	House-keeping genes	7p22	exon 6	exon 6	106		
TATA box binding protein	NM_001172085	TBP	House-keeping genes	6q27	exon 5	exon 6	88		
beta-2-microglobulin	NM_004048	B2M	House-keeping genes	15q21-q22.2	Junction 1-2	exon 2	163		

E24

ribosomal protein, large, P0	NM_053275	RPLP0	House-keeping genes	12q24.2	exon 6	exon 7	144		
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase I	NM_000194	HPRT1	House-keeping genes	Xq26.2	exon 6	exon 7	87		
Transferrin receptor (p90, CD71)	NM_001128148	TFRC	House-keeping genes	3q29	exon 5	exon 6	87		

E25

Table E3: Effect of BMP9 treatment on the transcriptional activity related to the ISR signaling pathway in PECs

Human Integrated Stress Response (ISR)							Ref: ISR1H1			
Gene name	RefSeq	Symbol	sub-pathways	Ch. Location	Forward Primer Location	Reverse Primer Location	Amplicon size (bp)	Fold Change	p-value	
solute carrier family 1 member 4	NM_003038.4	SLC1A4	Amino acid transport	2p14	exon 7	exon 8	140	1.50	0,1888	
solute carrier family 35 member A4	NM_080670.3	SLC35A4	Amino acid transport	5q31.3	exon 3	exon 3	146	1.79	0,2798	
solute carrier family 3 member 2	NM_001012662.2	SLC3A2	Amino acid transport	11q12.3	exon 6	exon 7	134	1.29	0,3787	
solute carrier family 7 member 11	NM_014331.3	SLC7A11	Amino acid transport	4q28.3	exon 10	exon 11	111	-1.14	0,7363	
solute carrier family 7 member 5	NM_003486.6	SLC7A5	Amino acid transport	16q24.2	exon 5	exon 6	144	4.61	0,2854	
asparaginyl-tRNA synthetase	NM_004539.3	NARS	Aminoacylation	18q21.31	exon 9	exon 10	129	1.10	0,7106	
apoptotic peptidase activating factor 1	NM_181861.1	APAF1	Apoptotic process	12q23	exon 5	exon 6	109	1.30	0,3653	
BCL2 binding component 3	NM_001127240.2	BBC3	Apoptotic process	19q13.3-q13.4	exon 4	exon 4	88	1.47	0,2115	
BCL2, apoptosis regulator	NM_138621.4	BCL2	Apoptotic process	2q13	junction 1-2	exon 2	64	1.48	0,297	
baculoviral IAP repeat containing 2	NM_001166.3	BIRC2	Apoptotic process	11q22	exon 2	exon 3	107	1.30	0,3718	
baculoviral IAP repeat containing 3	NM_182962.1	BIRC3	Apoptotic process	11q22	exon 3	exon 4	123	-1.54	0,0811	
baculoviral IAP repeat containing 5	NM_001012271.1	BIRC5	Apoptotic process	17q25.3	exon 2	exon 2	65	1.35	0,432	
baculoviral IAP repeat containing 7	NM_139317.2	BIRC7	Apoptotic process	20q13.33	exon 1	exon 2	141	3.88	0,3351	
Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	NM_005252.3	FOS	Apoptotic process	14q24.3	junction 1-2	exon 2	136	1.45	0,1995	
NLR family apoptosis inhibitory protein	NM_004536.2	NAIP	Apoptotic process	5q13.2	exon 12	exon 13	124	-1.15	0,712	
nuclear protein 1, transcriptional regulator	NM_001042483.1	NUPR1	Apoptotic process	16p11.2	exon 2	exon 2	109	1.14	0,7115	
phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	NM_021127.2	PMAP1	Apoptotic process	18q21.32	exon 1	exon 2	95	-2.27	0,0029	
siah E3 ubiquitin protein ligase 1	NM_001006610.1	SHAH1	Apoptotic process	16q12	exon 2	exon 2	104	-1.61	0,0848	
siah E3 ubiquitin protein ligase 2	NM_005067.5	SHAH2	Apoptotic process	3q25	exon 1	exon 2	138	-1.18	0,6403	
TNF receptor superfamily member 10b	NM_003842.4	TNFRSF10B	Apoptotic process	8p22-p21	junction 5-6	exon 7	114	1.00	0,9923	
X-linked inhibitor of apoptosis	NM_001167.3	XIAP	Apoptotic process	Xq25	exon 3	exon 4	138	1.10	0,7072	
autophagy related 10	NM_001131028.1	ATG10	Autophagy	5q14.1	exon 8	exon 8	66	-1.37	0,1575	
autophagy related 12	NM_004707.3	ATG12	Autophagy	5q21-q22	exon 2	exon 2	81	-1.33	0,1818	
autophagy related 16 like 1	NM_030803.6	ATG16L1	Autophagy	2q37.1	exon 13	exon 14	135	1.10	0,7902	
autophagy related 3	NM_022488.3	ATG3	Autophagy	3q13.2	exon 10	exon 11	93	-1.18	0,6513	
autophagy related 5	NM_004849.2	ATG5	Autophagy	6q21	exon 2	exon 2	89	1.00	0,9986	
autophagy related 7	NM_006395.2	ATG7	Autophagy	3p25.3-p25.2	exon 2	exon 3	91	3.06	0,1952	
GABA type A receptor-associated protein	NM_007278.1	GABARAP	Autophagy	17p13.1	exon 1	exon 2	109	1.01	0,9705	
GABA type A receptor associated protein like 2	NM_007285.6	GABARAPL2	Autophagy	16q22.1	exon 3	exon 4	122	-1.39	0,1914	
NBR1, autophagy cargo receptor	NM_005899.4	NBR1	Autophagy	17q21.31	exon 11	exon 12	114	1.10	0,8046	

E26

sequestosome 1	NM_003900.4	SQSTM1	Autophagy	5q35	exon 7	exon 8	130	-2.00	0,0193
asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	NM_133436.3	ASNS	Cellular amino acid metabolic process	7q21.3	exon 7	junction 7-8	124	-1.18	0,6622
activating transcription factor 4	NM_001675.2	ATF4	Cellular response to amino acid starvation	22q13.1	exon 1	exon 2	117	1.59	0,4619
beclin 1	NM_003766.3	BECN1	Cellular response to amino acid starvation	17q21	exon 3	exon 4	85	1.00	0,9876
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3	NM_002759.2	EIF2AK2	Cellular response to amino acid starvation	2p22-p21	exon 14	exon 15	98	-1.12	0,7209
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	NM_004836.5	EIF2AK3	Cellular response to amino acid starvation	2p12	exon 9	exon 9	108	-1.09	0,8084
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	NM_001013703.3	EIF2AK4	Cellular response to amino acid starvation	15q15.1	exon 20	exon 21	105	-1.10	0,3738
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha	NM_004094.4	EIF2S1	Cellular response to amino acid starvation	14q21.3	exon 6	exon 7	97	-1.10	0,7433
GCN1, eIF2 alpha kinase activator homolog	NM_006836.1	GCN1	Cellular response to amino acid starvation	12q24.23	exon 4	exon 5	149	1.45	0,2715
microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	NM_032514.2	MAP1LC3A	Cellular response to amino acid starvation	20q11.22	exon 4	exon 4	120	-1.61	0,0865
solute carrier family 38 member 2	NM_018976.4	SLC38A2	Cellular response to amino acid starvation	12q13.11	exon 11	exon 12	75	1.91	0,2127
damage specific DNA binding protein 1	NM_001923.3	DDB1	DNA damage response	11q12-q13	exon 10	exon 11	141	1.54	0,4701
damage specific DNA binding protein 2	NM_000107.2	DDB2	DNA damage response	11p12-p11	exon 3	exon 4	102	-1.34	0,1791
DNA damage inducible transcript 4	NM_019058.2	DDIT4	DNA damage response	10q22.1	exon 3	exon 3	131	2.60	0,3155
activating transcription factor 6	NM_007348.3	ATF6	Endoplasmic reticulum unfolded protein response	1q22-q23	exon 6	exon 7	111	-1.10	0,3681
heat shock protein family A (Hsp70) member 5	NM_005347.4	HSPA5	Endoplasmic reticulum unfolded protein response	9q33.3	exon 5	exon 6	140	-1.13	0,3399
nuclear factor, erythroid 2 like 2	NM_006164.4	NFE2L2	Endoplasmic reticulum unfolded protein response	2q31	exon 3	exon 4	130	1.00	0,9894
phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic	NM_006218.2	PIK3CA	Protein phosphorylation	3q26.3	exon 7	exon 8	132	-1.19	0,6281
AKT serine/threonine kinase 1	NM_005163.2	AKT1	Protein phosphorylation	14q32.32-q32.33	exon 10	exon 11	128	1.60	0,418
inhibitor of Bruton tyrosine kinase	NM_015525.3	IBTK	Protein phosphorylation	6q14.1	exon 25	exon 26	108	1.02	0,9626
mechanistic target of rapamycin	NM_004958.3	MTOR	Protein phosphorylation	1p36	exon 27	exon 28	127	1.19	0,5935
actin gamma 1	NM_001199954.1	ACTG1	Protein transport	17q25	exon 2	exon 2	67	3.11	0,2015
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1	NM_014413.3	EIF2AK1	Regulation of translation	7p22.1	exon 12	exon 13	107	1.10	0,7112
eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha	NM_001414.3	EIF2B1	Regulation of translation	12q24.3	exon 5	exon 6	98	-1.13	0,7301
eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma	NM_001415.3	EIF2S3	Regulation of translation	Xp22.11	exon 5	exon 6	100	1.00	0,9949
protein phosphatase 1 catalytic subunit alpha	NM_002708.3	PPP1CA	Regulation of translation	11q13	junction 6	exon 7	88	-1.11	0,3639
ribosomal protein L7	NM_000971.3	RPL7	Regulation of translation	8q13.3	junction 5-6	exon 6	129	-1.82	0,0029
sestrin 2	NM_031459.4	SESN2	Regulation of translation	1p35.3	exon 4	exon 5	140	2.57	0,3153
tryptophanyl-tRNA synthetase	NM_004184.3	WARS	Regulation of translation	14q32.2	exon 8	exon 9	145	-1.10	0,7743
BCL2 like 11	NM_138621.4	BCL2L11	Response to endoplasmic reticulum stress	2q13	exon 1	exon 1	129	-1.39	0,0014
CCAAT/enhancer binding protein beta	NM_005194.2	CEBPB	Response to endoplasmic reticulum stress	20q13.1	exon 1	exon 1	126	2.79	0,2449
DNA damage inducible transcript 3	NM_001195053.1	DDIT3	Response to endoplasmic reticulum stress	12q13.1-q13.2	exon 4	exon 4	137	-1.64	0,09
endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	NM_001433.3	ERN1	Response to endoplasmic reticulum stress	17q23	exon 19	exon 20	139	1.16	0,6866

E27

endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha	NM_014584.2	ERO1A	Response to endoplasmic reticulum stress	14q22.1	exon 12	exon 12	119	-1,12	0,7215
protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	NM_014330.3	PPP1R15A	Response to endoplasmic reticulum stress	19q13.2	exon 2	exon 2	139	-1,55	0,0785
protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B	NM_032833.4	PPP1R15B	Response to endoplasmic reticulum stress	1q32.1	exon 1	exon 1	75	1,15	0,7077
tribbles pseudokinase 3	NM_021158.4	TRIB3	Response to endoplasmic reticulum stress	20p13-p12.2	exon 3	exon 4	117	1,25	0,7352
X-box binding protein 1	NM_005080.3	XBP1	Response to endoplasmic reticulum stress	22q12.1	exon 1	exon 2	102	1,46	0,3051
ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic	NM_001983.3	ERCC1	Response to stress	19q13.32	exon 6	exon 7	100	1,09	0,7248
ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase	NM_000400.3	ERCC2	Response to stress	19q13.32	Junction 4-5	exon 5	99	2,65	0,1191
ERCC excision repair 3, TFIIH core complex helicase	NM_000122.1	ERCC3	Response to stress	2q21	exon 12	exon 13	108	-1,34	0,1823
growth arrest and DNA damage inducible alpha	NM_001924.3	GADD45A	Response to stress	1p31.2	exon 1	exon 2	100	-1,33	0,5134
BCL2 interacting protein 3 like	NM_004331.2	BNIP3L	Signal transduction	8p21	exon 2	exon 3	97	-1,54	0,0752
activating transcription factor 3	NM_001674.3	ATF3	Transcription regulation	1q32.3	exon 3	exon 4	124	-1,45	0,0634
activating transcription factor 5	NM_012068.5	ATF5	Transcription regulation	19q13.3	exon 3	exon 4	112	2,36	0,4017
chromobox 4	NM_003655.2	CBX4	Transcription regulation	17q25.3	exon 4	exon 5	73	1,20	0,5938
CCAAT/enhancer binding protein gamma	NM_001806.3	CEBPB	Transcription regulation	19q13.11	exon 2	exon 2	102	1,05	0,8583
egl-9 family hypoxia inducible factor 2	NM_080732.3	EGLN2	Transcription regulation	19q13.2	exon 4	exon 5	128	1,04	0,8846
egl-9 family hypoxia inducible factor 3	NM_022073.3	EGLN3	Transcription regulation	14q12	exon 3	exon 4	86	1,45	0,2087
LIM domain only 4	NM_006769.3	LMO4	Transcription regulation	1p22.3	exon 2	exon 3	86	-1,33	0,1911
nuclear factor kappa B subunit 1	NM_003998.3	NFKB1	Transcription regulation	4q24	exon 7	exon 7	67	-1,05	0,8697
transcription factor binding to IGHM enhancer 3	NM_006521.5	TFE3	Transcription regulation	Xp11.22	exon 5	exon 6	117	-1,01	0,9847
transcription factor EB	NM_001167827.2	TFEB	Transcription regulation	6p21	exon 6	exon 7	90	1,62	0,3886
thioredoxin interacting protein	NM_006472.5	TXNIP	Transcription regulation	1q11	exon 4	exon 5	104	1,25	0,5066
peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	NM_021130	PPIA	House-keeping genes	7p13	exon 1	exon 2	97		
actin, beta	NM_001101	ACTB	House-keeping genes	7p22	exon 6	exon 6	106		
TATA box binding protein	NM_001172085	TBP	House-keeping genes	6q27	exon 5	exon 6	88		
beta-2-microglobulin	NM_004048	B2M	House-keeping genes	15q21-q22.2	junction 1-2	exon 2	163		
ribosomal protein, large, P0	NM_053275	RPLP0	House-keeping genes	12q24.2	exon 6	exon 7	144		
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase I	NM_000194	HPRT1	House-keeping genes	Xq26.2	exon 6	exon 7	87		
Transferrin receptor (p90, CD71)	NM_001128148	TFRC	House-keeping genes	3q26.2-qter	exon 5	exon 6	87		
Glucuronidase, beta	NM_000181.3	GUSB	House-keeping genes	7q11.21	exon 4	exon 5	104		

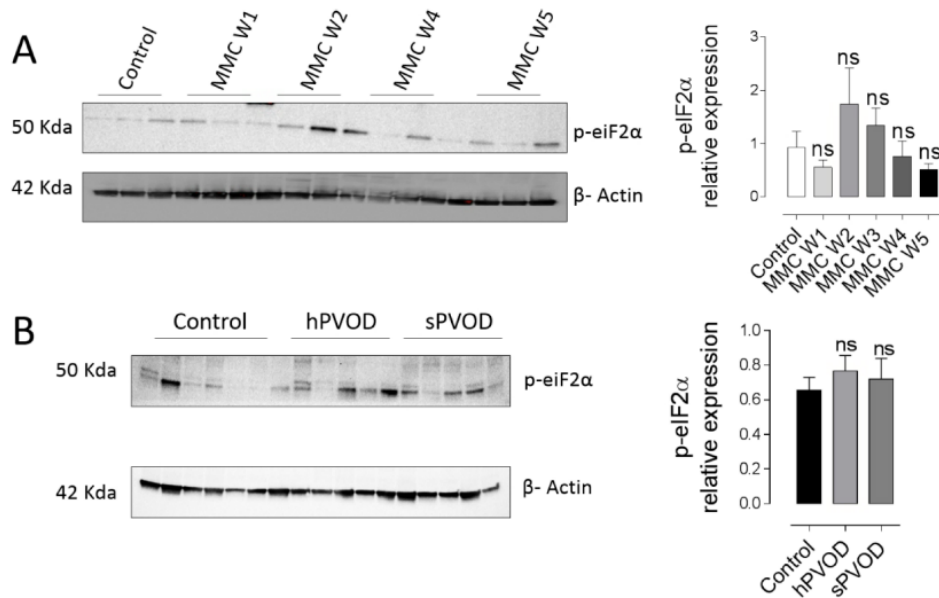


Figure E1: Analysis of p-eiF2 α in lung from hPVOD, sPVOD patients and MMC-exposed rats. A, p-eiF2 α expression measured by Western blot analysis in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure). B, p-eiF2 α in lung from hPVOD and sPVOD. β -Actin was used as loading control. ns = non-significant.

432x283mm (96 x 96 DPI)

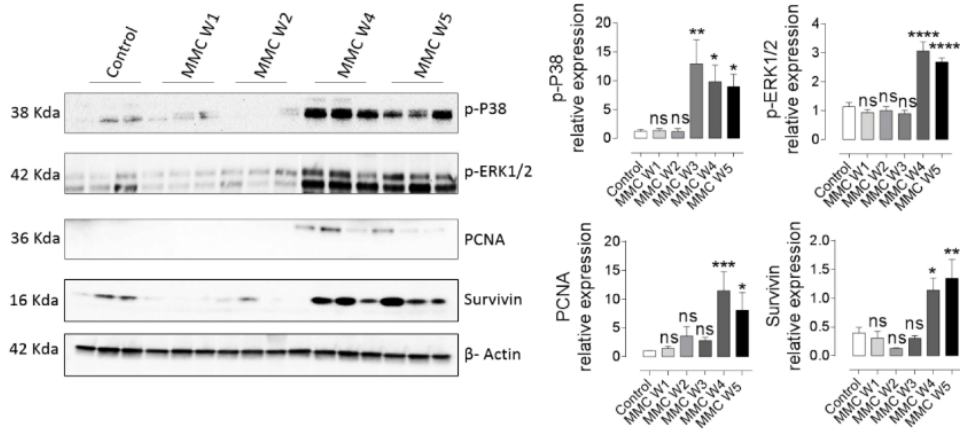


Figure E2: Upregulation of mitogenic and anti-apoptotic pathways in MMC-exposed rats: Pulmonary levels of P-P38, p-ERK1/2, PCNA and Survivin in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, **** $P < 0.0001$

532x248mm (96 x 96 DPI)

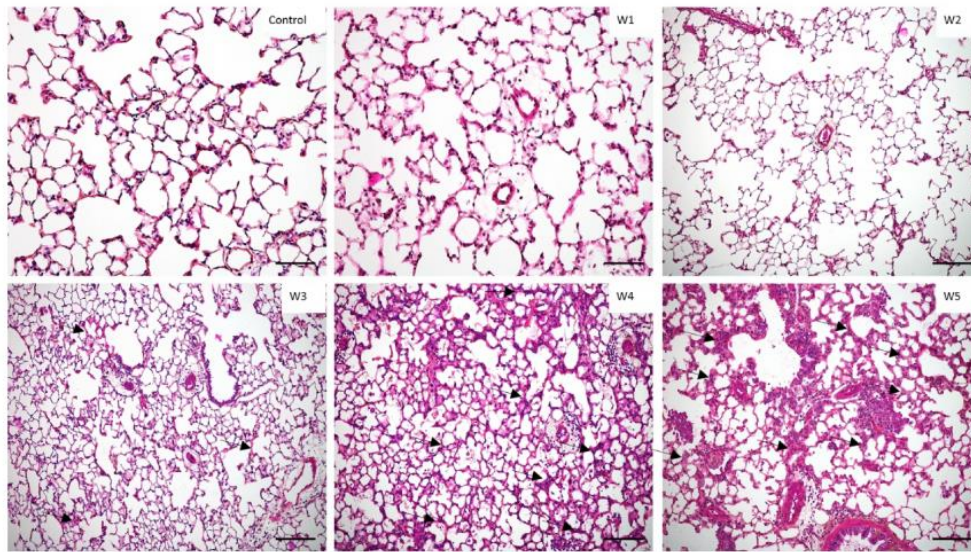


Figure E3: MMC induces progressive development of foci of alveolar wall thickening suggestive of pulmonary capillary hemangiomatosis in rats.
HE stained paraffin embedded lung sections in control and MMC-exposed rats (1, 2, 3, 4 and 5 weeks after MMC-exposure) with foci of alveolar wall thickening (arrows) suggestive of pulmonary capillary hemangiomatosis developing overtime and becoming manifest at week 3 and progressive at week 4 and 5.

509x287mm (96 x 96 DPI)

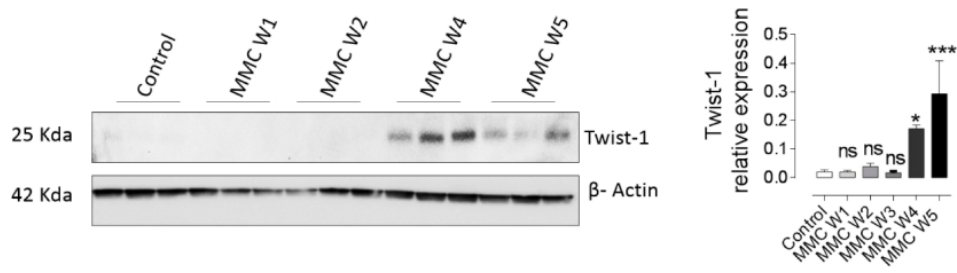


Figure E4: Analysis of protein Twist-1 expression in MMC-exposed rats. Twist1 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. Quantification of the Western blots are shown close to Western blots image * $P < 0.05$; *** $P < 0.0005$.

429x131mm (96 x 96 DPI)

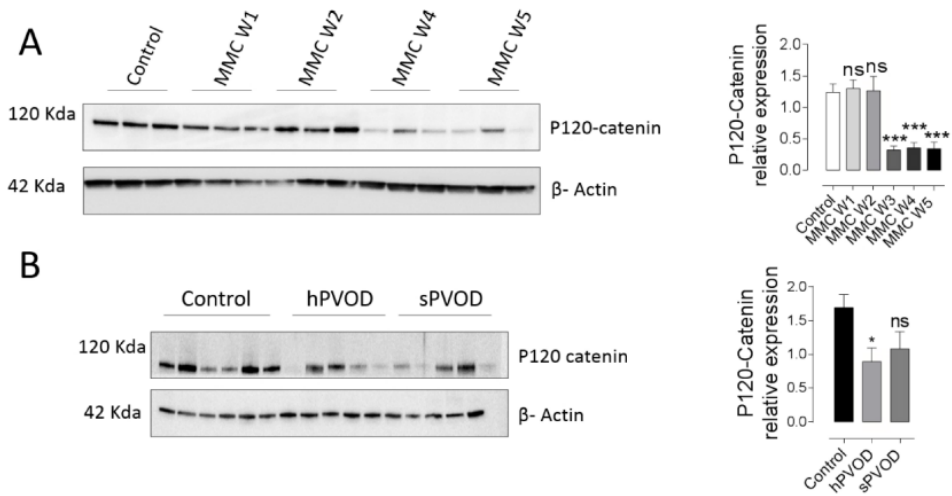


Figure E5: Analysis of protein p120-catenin expression in lung from sPVOD, hPVOD patients and in MMC-exposed rats.

Pulmonary levels of p120-catenin was analyzed by Western blotting during the development of PVOD in control and MMC exposed-rats (A) (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19) and in Human (B). β -Actin was used as loading control. Quantification of Western blots is shown near Western blot image. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0005$.

458x248mm (96 x 96 DPI)

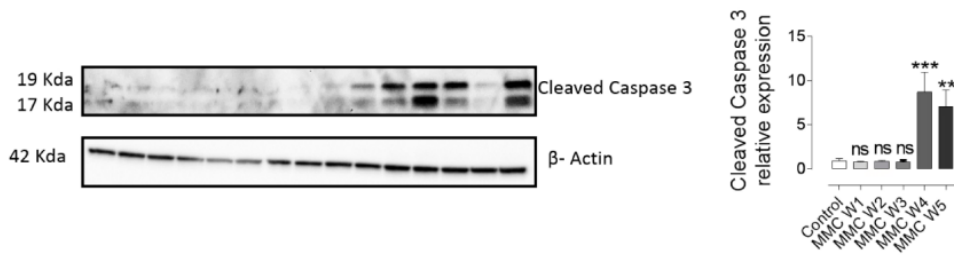


Figure E6: Apoptosis is enhanced in MMC-induced PVOD. Pulmonary levels of cleaved-Caspase 3 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19). β -Actin was used as loading control. Right panel represent the quantification of the Western blots. ** $P < 0.005$. *** $P < 0.0005$.

463x129mm (96 x 96 DPI)

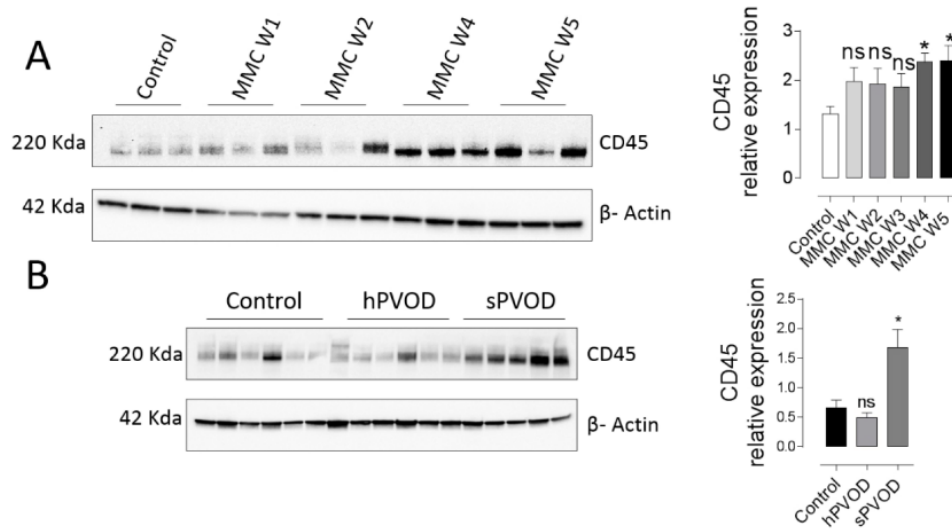


Figure E7: Inflammation is enhanced in lung from hPVOD, spVOD patients and in MMC-induced PVOD. Pulmonary levels of CD45 measured by Western blot analysis (WB) in control and MMC-exposed rats (A) (1, 2, 4 and 5 weeks after MMC-exposure, week 3 is displayed in supplemental figure E19) and in lung from hPVOD and spVOD (B). β -Actin was used as loading control. Right panel represent the quantification of the Western blots. * $P < 0.05$.

419x239mm (96 x 96 DPI)

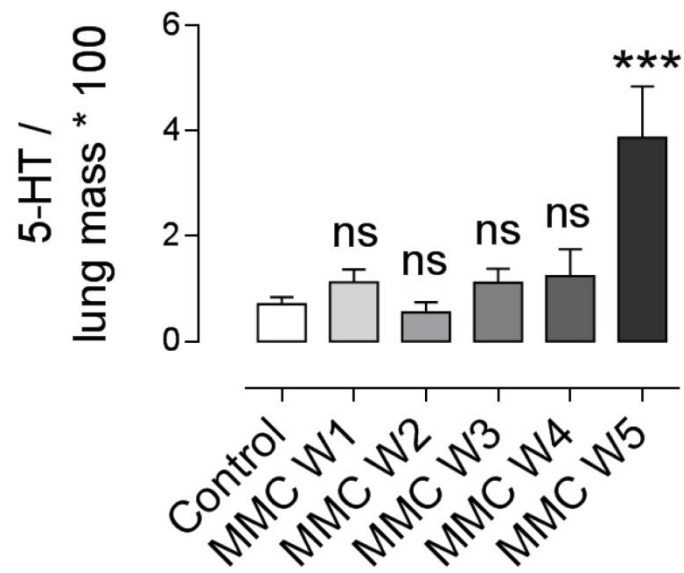


Figure E8: Dysregulation of serotonin pathway in MMC-induced PVOD. Pulmonary serotonin (5-HT) content was significantly increased at week 5. *** $P < 0.0005$.

173x151mm (96 x 96 DPI)

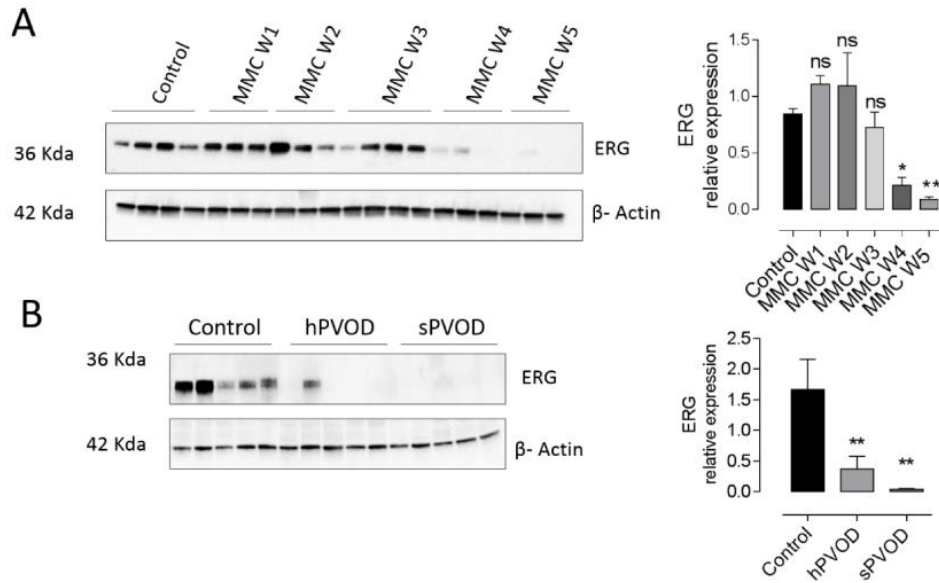


Figure E9: Analysis of ERG expression in lung from hPVOD, sPVOD patients and MMC-exposed rats. A, ERG expression measured by Western blot analysis in control and MMC-exposed rats (1, 2, 3, 4 and 5 weeks after MMC-exposure). B, ERG in lung from hPVOD and sPVOD. β -Actin was used as loading control * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$.

439x281mm (96 x 96 DPI)

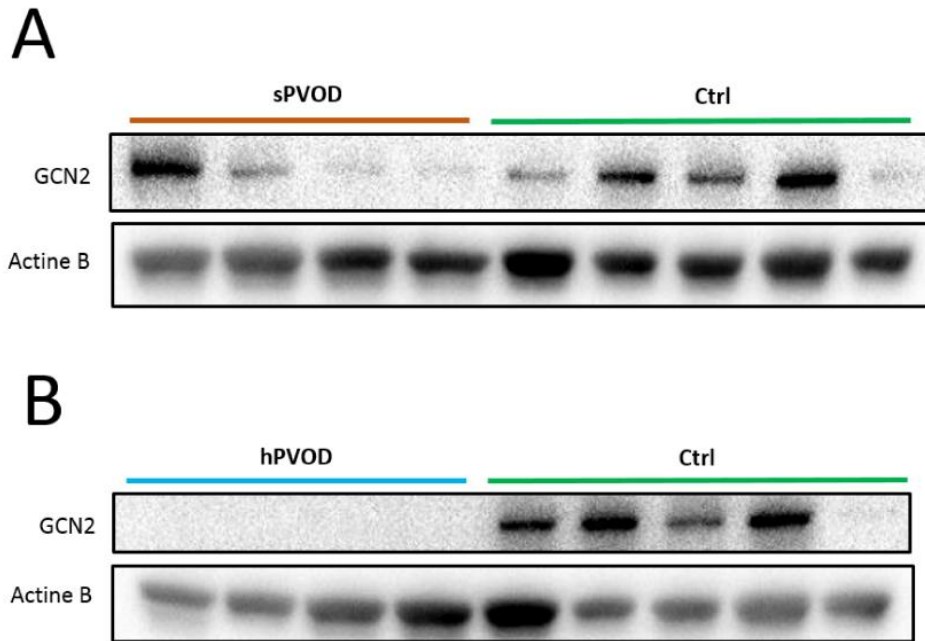


Figure 10: Additional analysis of GCN2 expression in lung from hPVOD, sPVOD patients
 A, GCN2 lung expression measured by Western blot analysis in sPVOD patients. B, GCN2 lung expression
 hPVOD. β -Actin was used as loading control.
 hPVOD samples are originating from patients with nonsense/frameshift mutations in EIF2AK4.

241x170mm (96 x 96 DPI)

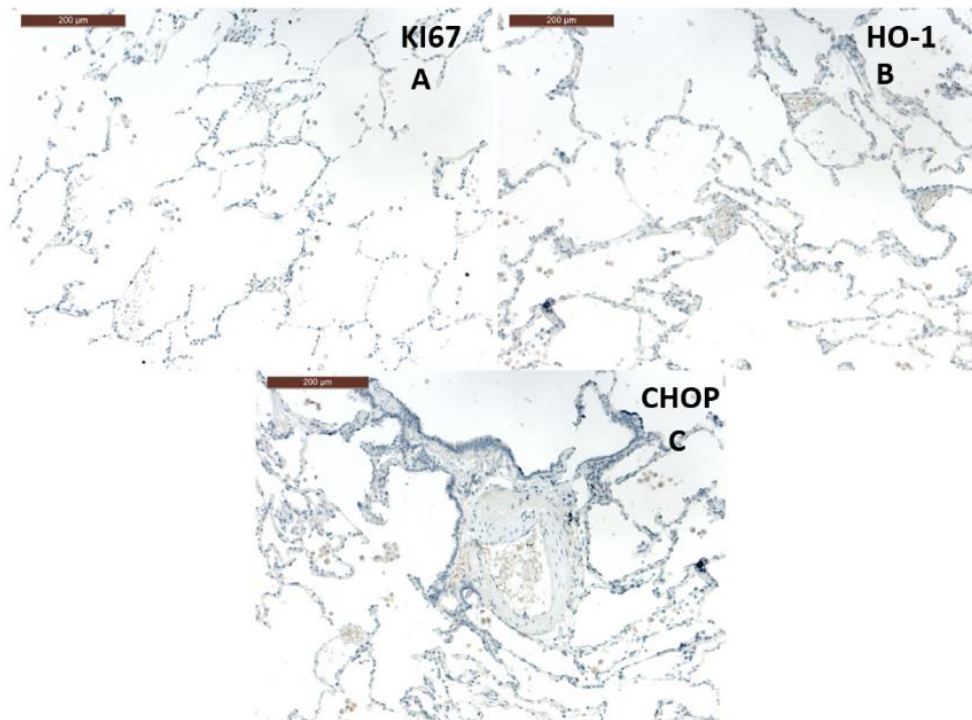


Figure E11: Analysis of Ki67, HO-1 and CHOP expression in control lung patients. Lung tissue control. No Ki67 staining within the alveolar septa (A). HO-1 (B) and CHOP (C) are not expressed in lung control.

287x212mm (96 x 96 DPI)

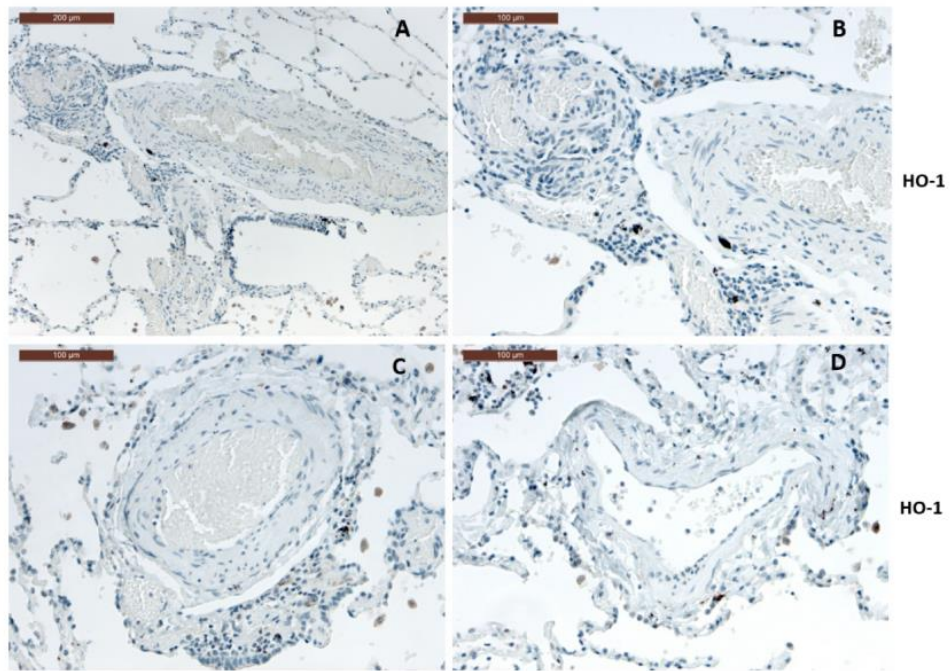


Figure E12: Analysis of HO-1 expression in PAH lung patients
HO-1 staining in lungs with pulmonary arterial hypertension. Pulmonary arteries (A, C) and pulmonary veins (B, D) do not express HO-1 staining is not found in lung explants of PAH patients.

369x253mm (96 x 96 DPI)

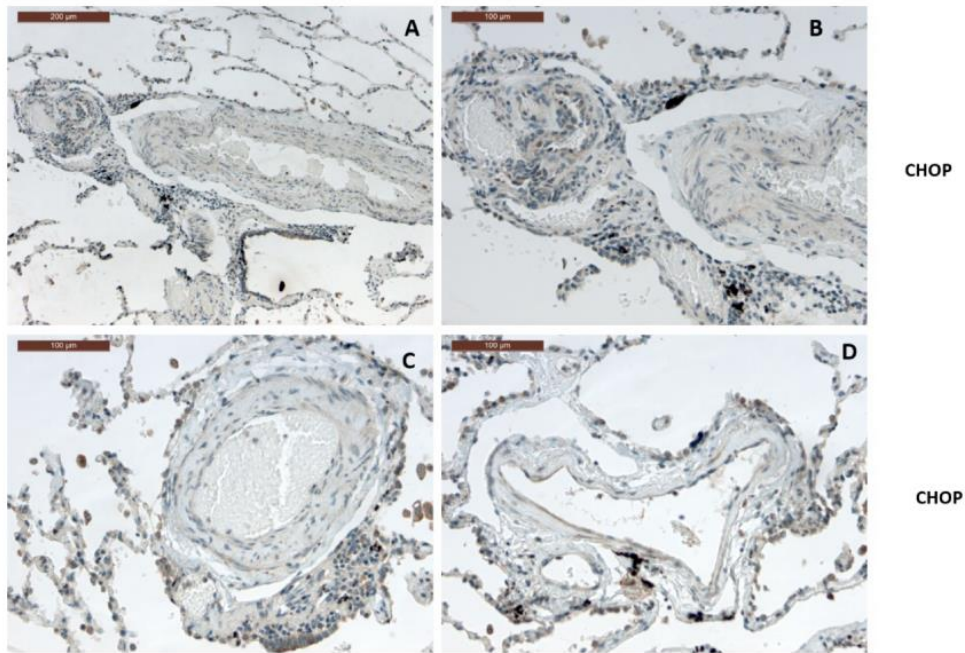


Figure E13: Analysis of CHOP expression in PAH lung patients
 DDIT3 (CHOP) staining in lungs with pulmonary arterial hypertension. Pulmonary arteries do not express DDIT3, while in plexiform lesion a very faint staining become visible within the endothelial cells (B). No staining is observed in small muscular arteries (C). A very faint staining is observed in endothelial cells of small veins (D).

375x251mm (96 x 96 DPI)

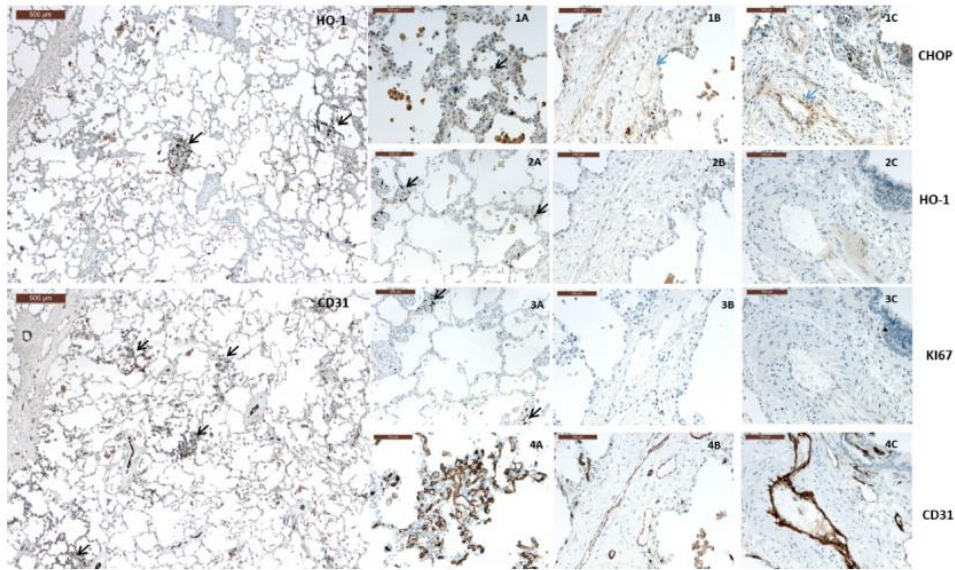


Figure E14: Analysis of Ki67, HO-1 and CD31 expression in sPVOD lung patients PVOD without EIF2AK4 mutation. DDIT3 (CHOP) staining in PVOD lung; endothelial staining is visible in both remodeled veins (1B, blue arrow) and arteries (1C, blue arrow). The staining becomes faint in smooth muscle cells whereas it is well observed in cytoplasm of bronchial cells, alveolar cells and macrophages (1A, 1B, 1C black arrows). HO-1 staining in PVOD lungs is observed in interstitial cells within alveolar septa in capillary hemangiomatosis foci (2A). The labelling is strong and highlights interstitial cells with cytoplasmic extensions. Outside these foci no staining is observed. The endothelial cells do not express HMOX. Ki67 staining highlights cells engaged in proliferation. Scant interstitial cells are labelled within capillary hemangiomatosis foci and in bronchial basal layer. CD31 staining underlines endothelial cells within alveolar septa (4A) and of pulmonary vessels (4B, 4C).

445x258mm (96 x 96 DPI)

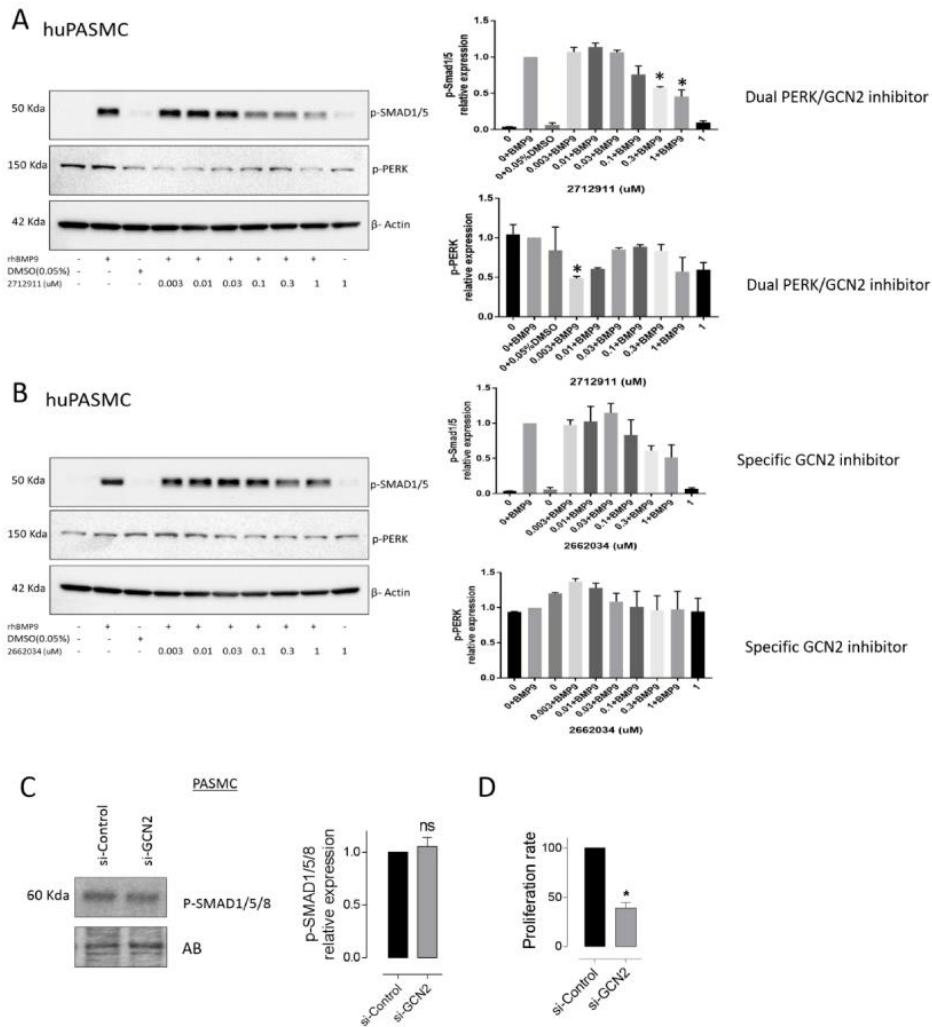


Figure E15: Effect of GCN2 and PERK/GCN2 dual inhibitor on BMP-9 signaling in huPASC cells. 2712991 is PERK/GCN2 dual inhibitor, 2662034 is GCN2 inhibitor. A, Effect of PERK/GCN2 dual inhibitor on BMP-9 signaling and PERK phosphorylation level in huPASC. B, Effect of specific GCN2 inhibitor on BMP-9 signaling and PERK phosphorylation in huPASC. C, Effect of siGCN2 on p-SMAD 1/5/8 phosphorylation in huPASC. D, Effect of siGCN2 on PASC proliferation. β -Actin (A, B) and Amido Black (C) was used as loading control. Right panels represent the quantification of the Western blots (Left panels). * $P < 0.05$.

615x665mm (96 x 96 DPI)

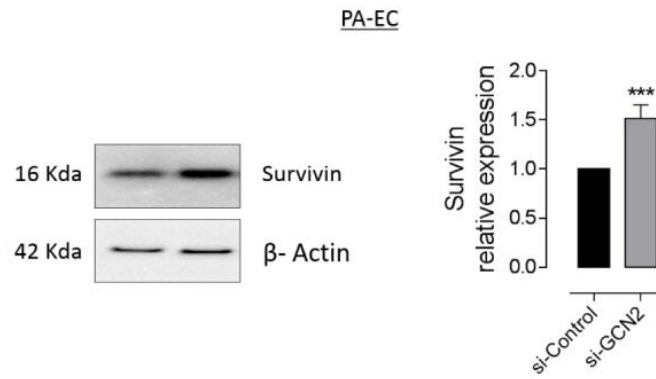


Figure E16: Knockdown of GCN2 in human pulmonary endothelial cells increases survivin expression. Consequence of GCN2 knockdown on Survivin expression in human PAEC (n=4)

388x162mm (96 x 96 DPI)

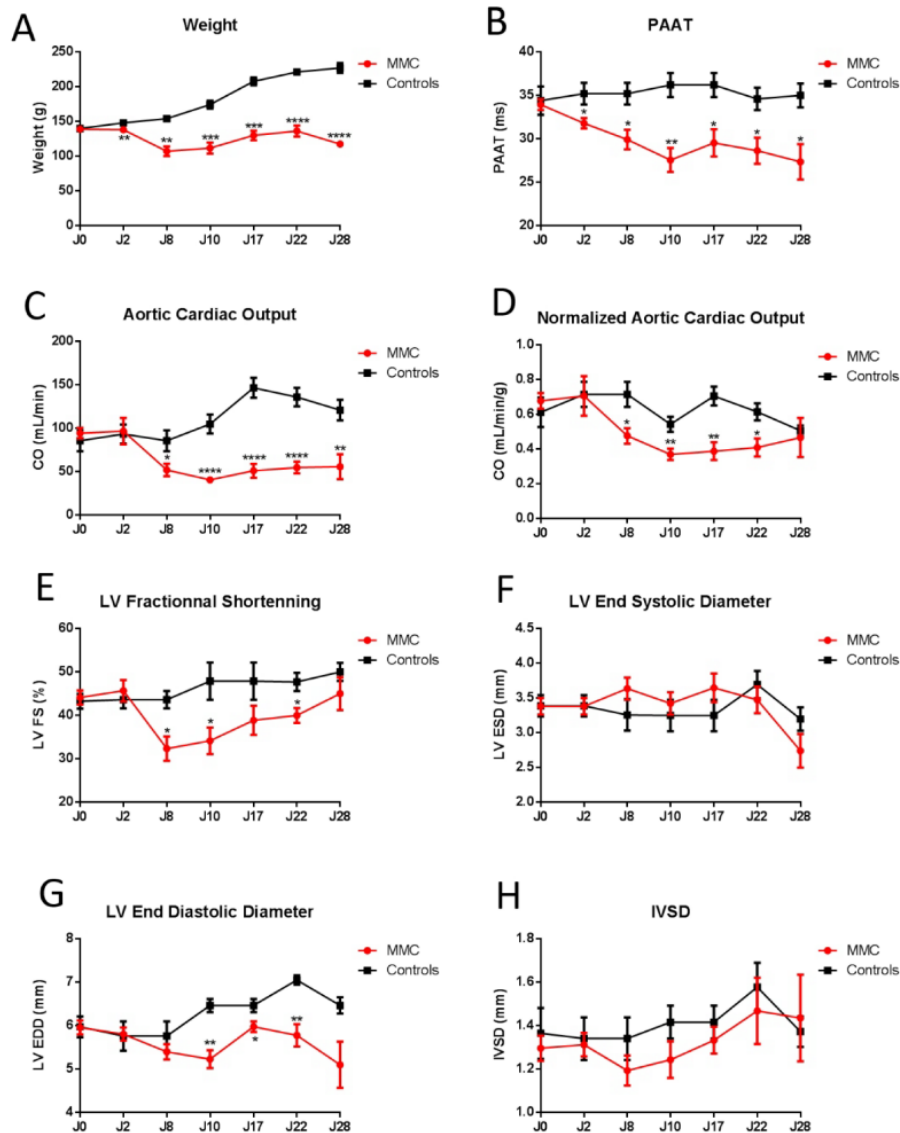


Figure E17: Effect of MMC on cardiac function in rats

Echocardiographic measurement of MMC exposed and control rats (J0, J2, J8, J10, J17, J22 and J28) of Weight (A), PAAT (B), Aortic Cardiac Output (C), Normalized Cardiac Output (D), LV Fractional Shortening (E), LV ESD (F), LV EDD (G) and IVDS (H).

Strikingly, PAAT was significantly lower in MMC exposed-rats as compared to controls, as soon as day 2 after the first MMC injection and remained lower for the whole follow-up. This was followed by a lower CO from day 8 to day 28. If normalized to the body weight, decreased CO was transient from day 8 to day 22. Interestingly, LVFS decreased following the same kinetic. Decreased LVFS was mainly attributable to lower LVEDD. IVSD was unchanged for the whole follow up indicating the absence of LV hypertrophy.

It has been shown that the use of echocardiography for assessment of cardiac anatomy, function, and hemodynamics can be consistently applied to the rat and replicates much of the information used routinely in human echocardiography. In this context, the LVFS are similar to those reported for healthy human beings (15). LVFS > 25% being the normal range, the LVFS values while decreased in MMC-exposed rat are not pathologic. Decreased CO could be linked to LV function alteration but can equally be attributed to right

ventricular dysfunction. Moreover, toxicities of chemotherapy like MMC can result in clinically significant diarrhea leading to hypovolemia, another relevant trigger of low CO. At last, cardiotoxicity of chemotherapy like doxorubicin are associated to dilated cardiomyopathy (16) that doesn't fit with the lower LVEDD we measured in MMC exposed rat.

423x533mm (96 x 96 DPI)

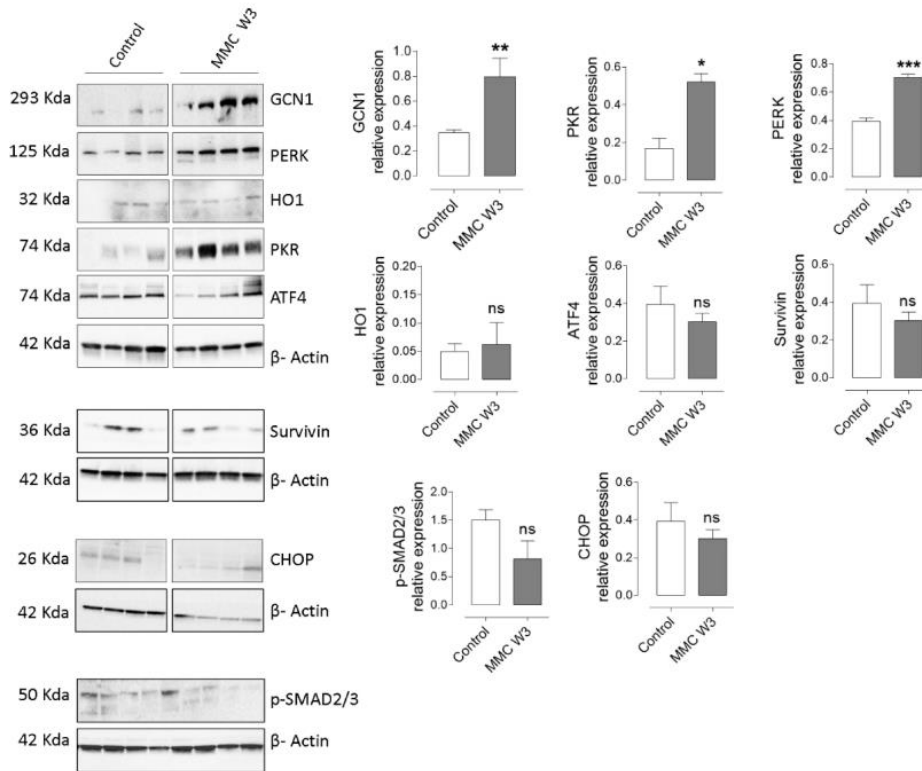


Figure E18: Pulmonary levels of p-P38, p-ERK1/2, PCNA, Survivin, GCN-1, PERK, HO-1, PKR, ATF4, CHOP, p-SMAD2/3 and Survivin in MMC-exposed rats.

A, Pulmonary levels of p-P38, p-ERK1/2, PCNA and Survivin expression in controls and MMC exposed rats (week 1, 2, 4 and 5). B Pulmonary levels of GCN1, PERK, HO-1, PKR, ATF4, CHOP, p-SMAD2/3 and Survivin in control and 3 weeks after MMC-exposure in rats. β -Actin was used as loading control. * $P < 0.05$ ** $P < 0.005$ *** $P < 0.0005$ **** $P < 0.0001$.

323x268mm (150 x 150 DPI)

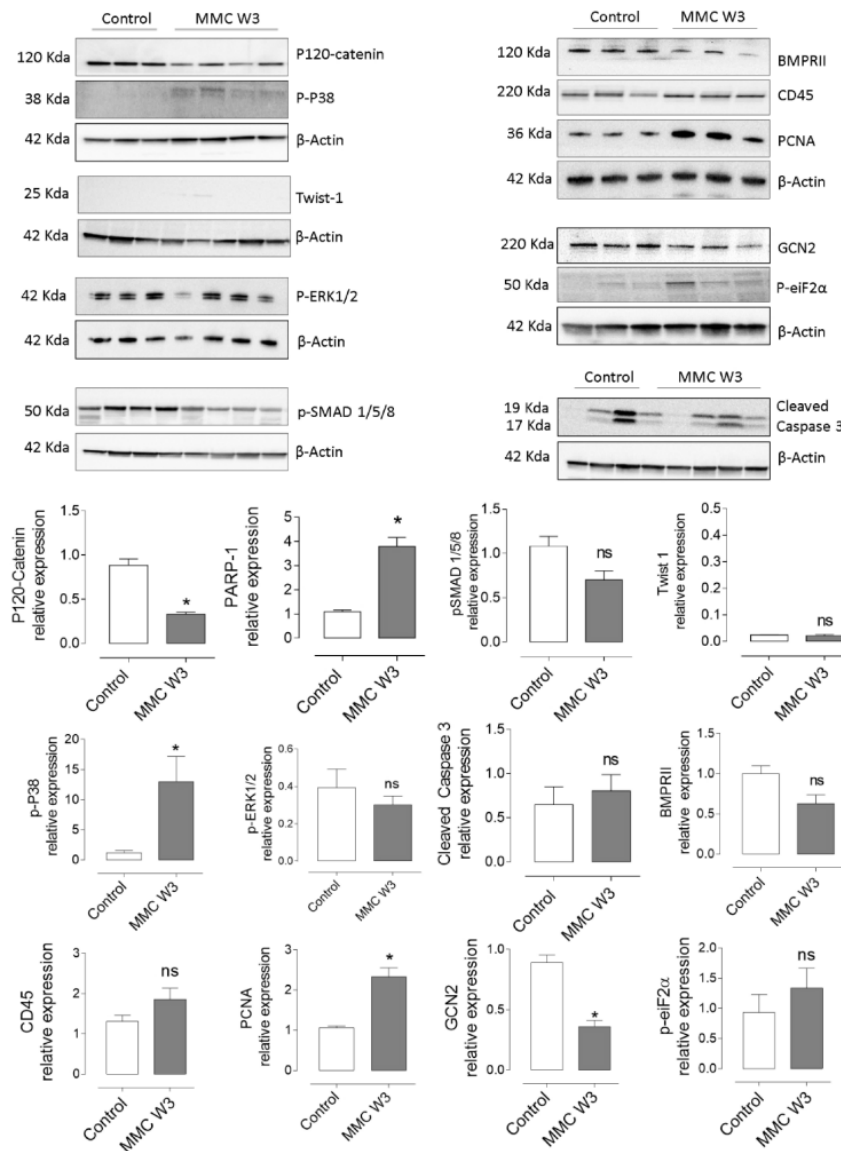


Figure E19: Pulmonary levels of P-120-Catenin, p-SMAD1/5/8, Twist 1, P-P38, p-ERK1/2, cleaved Caspase 3, BMPRII, CD45, PCNA, GCN2 and p-eiF2α three weeks after MMC-exposure. A, Pulmonary levels of P-120-Catenin, p-SMAD1/5/8, Twist 1, P-P38, p-ERK1/2, cleaved Caspase 3, BMPRII, CD45, PCNA, GCN2 and p-eiF2α in control and 3 weeks after MMC-exposure in rats. β-Actin was used as loading control. *P<0.05.

508x688mm (96 x 96 DPI)

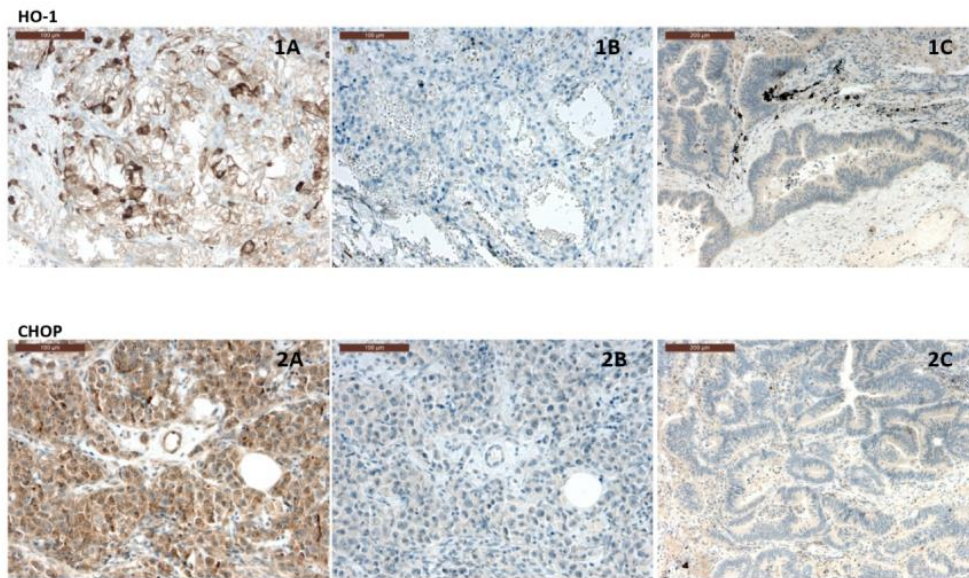


Figure E20: Positive and negative controls of HO-1 and CHOP in human lung patients. HO-1 positive and negative controls. HO-1 is expressed in membranes and cytoplasm of clear cells renal carcinoma (1A). The negative control has been performed on the same tissue by withdrawing the primary antibody (1B). HO-1 is not expressed in colorectal carcinoma [(1C) negative control]. DDIT3 (CHOP) staining appears strong within the cytoplasm of neoplastic cells (mediastinal seminoma (2A). Endothelial staining is visible in tumor associated vessels (arrow). Negative control has been assessed on the same tissue by primary antibody withdrawal. No staining is found in colorectal cancer tissue, we used as additional negative control (2C).

397x238mm (96 x 96 DPI)

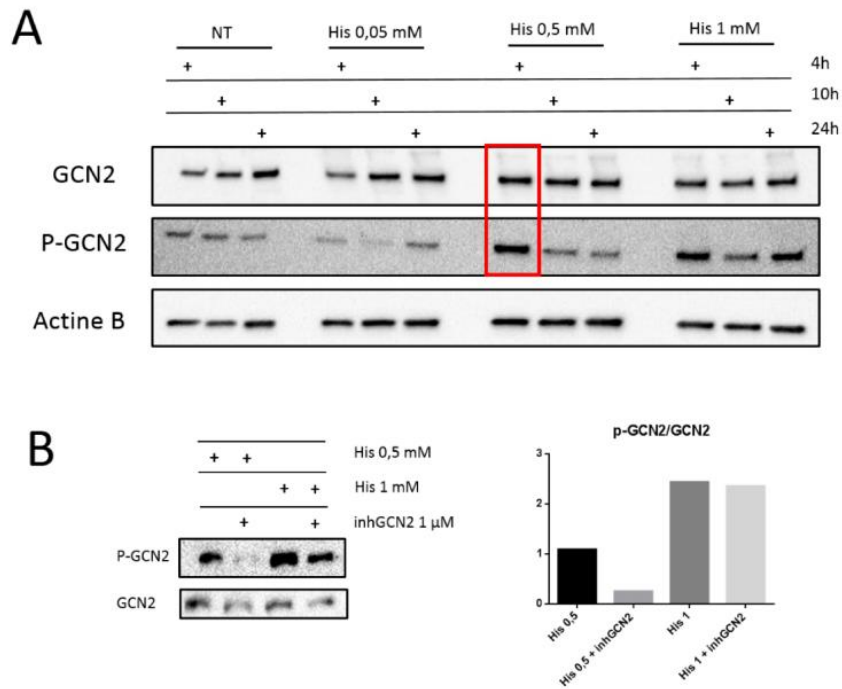


Figure E21: Determination of the histidinol concentration in in vitro experiments. Human PAEC levels of A, p-GCN2 (Thr 899) and GCN2 were analyzed by Western Blotting after treatment with several doses of Histidinol (0.05 mM, 0.5 mM and 1 mM) at several times (4h, 10h and 24h). β -Actin was used as loading control. B, p-GCN2 (Thr 899) and GCN2 were analyzed by Western Blotting after treatment with Histidinol 0.5 mM and 1 mM alone and co-treated with the GCN2 inhibitor 1 μ M (2662034) (left panel) with the quantification data (right panel).

350x267mm (96 x 96 DPI)

Projet 2:

Durant ma thèse, mon second projet a été d'étudier les mécanismes de pénétrance des mutations BMPRII chez l'humain et chez l'animal.

Epissage Alternatif de BMPR2 : Implication du Variant B dans le développement de l'HTAP

Manaud G, Chesné J, Hautefort A, Preussner J, Pullamsetti SS, Looso M, Girerd B, Deleuze JF, Seeger W, Fadel E, Simonneau G, Montani D, Humbert M, Perros F

1- Rationnel

La classification de l'HTAP comprend les formes idiopathiques (HTAPi) et héritables (HTAPh) où 70% de ces dernières sont liées à une mutation germinale autosomique dominante du gène *BMPR2*. Ce gène appartient à la famille du TGF- β . Les mutations de *BMPR2* représentent donc actuellement le facteur de risque génétique principal des formes d'HTAP héritables. Cependant, la pénétrance de ces mutations est faible (environ 20%) ce qui suggère que d'autres acteurs sont impliqués dans le développement de l'HTAP, ou à l'inverse dans sa prévention dans 80% des cas. Dans ce deuxième cas de figure, il est possible que l'allèle non muté de *BMPR2* soit en mesure de compenser l'allèle muté. En effet Hamid et al ont montré que la faible expression de l'allèle sauvage joue un rôle dans le développement de la pathologie (Hamid et al., 2009). Plusieurs mécanismes ont été décrits afin d'expliquer la faible pénétrance des mutations de *BMPR2* dans l'HTAP. En effet, Gomez Puerto et al, montrent que l'autophagie favorise la dégradation du récepteur sauvage et limite sa capacité de compensation et ainsi favorise le développement de l'HTAP (Gomez-Puerto et al., 2019). Ils montrent également que des facteurs inflammatoires tel que le TNF- α stimulent cette autophagie et contribuent à diminuer le taux de BMPRII et dans l'autre sens que le BMP-9 diminue l'autophagie et permet de conserver le récepteur BMPRII à la membrane plasmique (Gomez-Puerto et al., 2019). Le dimorphisme sexuel joue également un rôle dans la pénétrance de ces mutations : la pénétrance chez la femme est de 42% et de seulement 14% chez les hommes (Docherty et al., 2018; Evans et al., 2016). En effet, le métabolisme des œstrogènes est important dans le développement de la pathologie à la fois chez les hommes et les femmes (Fessel et al., 2013). Les femmes qui présentent un métabolisme des œstrogènes préférentiellement dirigé vers le métabolite 16-oestrogène développent une

HTAP alors que celles qui métabolisent en 2- or 4-oestrogène n'en développent pas (Austin et al., 2009b; White et al., 2012). Des résultats chez la souris confirment que le traitement par le 16-oestrogène induit le développement d'une HTAP et que l'inhibition du 16-oestrogène est protecteur (Chen et al., 2017).

L'épissage alternatif est un mécanisme qui permet à partir d'un unique ARNm de former différentes formes notamment en permettant la traduction ou non de certains exons. BMPRII est une protéine dont l'ARNm est épissée pour donner deux formes, la forme A qui correspond à la protéine totale et la forme B dont il manque l'exon 12 (correspondant à 500 acides aminés de la queue cytoplasmique de BMPRII). Un épissage alternatif de BMPRII dirigé vers la forme courte pourrait contribuer à moduler la pénétrance de la mutation dans l'HTAP en réduisant la forme totale (A) nécessaire à l'activation des voies canoniques et non canoniques et en favorisant la forme B qui, dépossédée de l'exon 12, ne peut pas activer les voies indépendantes des SMAD (Foletta et al., 2003). Cependant, le mécanisme d'épissage alternatif de BMPRII dans la pénétrance de l'HTAP n'a pas été étudié chez l'Homme, le rat et la souris. Dans cette étude nous avons posé l'hypothèse que l'expression du variant B de BMPRII de l'allèle non muté pouvait réduire sa capacité de compensation et affecter à la fois la voie canonique et non canonique de BMPRII et ainsi favoriser le développement de l'HTAP.

2- Objectifs de l'étude

Dans cette étude nous avons voulu dans un premier temps identifier un nouveau biomarqueur épigénétique servant d'outil diagnostique et pronostic dans les cellules circulantes humaines (LTCD4⁺). Le second objectif était d'étudier les mécanismes de pénétrance des mutations BMPRII chez l'humain et chez l'animal.

3- Méthodes

Pour le premier objectif nous avons extrait l'ADN des LTCD4⁺ humain issus de plusieurs groupes de patients (HTAPi, HTAPh, MVOP, Contrôles et porteurs sains de la mutation BMPR2). Par la suite nous avons identifié les sites CpG différenciellement méthylés. Enfin nous avons procédé à une analyse bio-informatique des résultats de méthylation d'ADN.

Pour le second objectif nous avons mesuré l'expression des variants d'épissage de BMPR2 par qPCR sur des cellules humaines ainsi que sur des tissus de rat et de souris.

4- Résultats

L'étude épigénétique a montré que chez les patients hPAH porteurs de mutations dans *BMPR2*, le promoteur du gène *QKI* est hypométhylé (<50%) par rapport aux porteurs de mutations apparemment sains, dans les lymphocytes circulants T CD4⁺. Ce gène code pour QKI (RNA-binding protein Quaking) une protéine qui contrôle entre autre l'épissage alternatif dans les cellules vasculaires (Caines et al., 2019). Cette fonction nous a amené à formuler l'hypothèse que QKI pourrait contrôler l'épissage alternatif de *BMPR2*, jouant ainsi un rôle dans la pénétrance de l'HTAP liée aux mutations de ce gène. Par la suite, nous avons étudié l'expression des variants d'épissage de *BMPRII* dans les T CD4⁺, ainsi que les dans les cellules endothéliales pulmonaires et les cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire.

Dans les LTCD4⁺ humains, nous n'avons observé aucune différence d'expression des variants de *BMPRII* dans les 3 groupes testés (HTAPh, HTAPi et Contrôles). De la même manière, nous n'avons observé aucune différence d'expression dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires humaines.

Cependant, dans les cellules endothéliales pulmonaires humaines, nous avons observé une augmentation de l'expression du variant B de *BMPRII* uniquement dans le groupe des HTAPh comparé aux HTAPi et aux contrôles. Les facteurs d'épissage QKI et SRSF2 ne sont en revanche pas modifiés dans le groupe HTAPh.

De plus, nous avons regardé l'expression des variants de *BMPR2* chez le rat et la souris et nous avons pu observer pour la première fois qu'aucune des deux espèces n'expriment le variant B de *BMPRII*.

Afin d'évaluer l'impact de la plus forte expression du variant B de *BMPR2*, nous avons regardé l'expression de la cofiline phosphorylée dans les 3 groupes de patients. De manière fort intéressante, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la cofiline et cet état d'activation de la cofiline est fortement corrélé à l'expression du variant B de *BMPR2*.

Cette diminution de la phosphorylation de la cofiline va impacter la régénération des filaments d'actine. Ces résultats suggèrent donc que les cellules endothéliales des patients HTAPh présentent une cofiline avec une activité exacerbée qui pourrait perturber la dynamique de l'actine et ainsi affecter la perméabilité de la barrière endothéliale vasculaire.

5- Discussion

Nos résultats mettent en évidence que l'épissage alternatif de BMPRII en faveur du variant B chez l'Homme pouvait être impliqué dans le développement pathologique de l'HTAP des formes héritables liées à la mutation du récepteur BMPRII.

Tout d'abord, les expériences de qPCR nous ont permis d'observer que le taux d'expression du variant B était plus important chez les patients atteints d'HTAP héritable (mutés *BMPR2*) comparé aux patients contrôles et aux patients atteints de forme idiopathique d'HTAP. Cette augmentation d'expression est spécifique aux cellules endothéliales pulmonaires et n'est pas retrouvée dans les cellules musculaires lisses (CMLs) et les cellules circulantes (LTCD4⁺).

Nous avons également mis en évidence que cette plus grande expression du variant B était fortement corrélée à une diminution de la phosphorylation de la cofiline. Cette baisse de cet état phosphorylé correspond à une hausse d'activité de cette dernière, qui a pour effet principal la régénération des filaments d'actine (Peverelli et al., 2017; Sousa-Squiavinato et al., 2019). Cela nous indique donc, que les cellules endothéliales de patients HTAP mutés *BMPR2* présentent donc une dynamique de l'actine fortement augmentée. Cela peut avoir pour effet, une perturbation de l'intégrité du cytosquelette et/ou une augmentation de la capacité migratoire de ces cellules et ainsi peut altérer l'intégrité de la barrière endothéliale vasculaire au niveau du poumon. Par ailleurs, nous avons voulu observer l'expression du variant B de BMPR2 chez le rongeur. De manière très surprenante, et pour la première fois, nous avons observé que ni le rat ni la souris n'expriment le variant B de *Bmpr2*, et ce, dans aucun tissu. Ces résultats novateurs pourraient expliquer que les HTP chez le rongeur sont relativement peu sévères. En effet sur les 23 modèles de souris génétiquement modifiés pour étudier l'HTP seules 14 présentent des pressions vasculaires pulmonaires supérieures à 30mmHg et seulement 4 au-dessus de 50 mmHg (Dai and Zhao, 2017; Ryan et al., 2013).

Chez les porteurs sains de la mutation *BMPR2*, le variant A de l'allèle sauvage est potentiellement en mesure de compenser la perte de l'allèle muté et ainsi expliquer la faible pénétrance de la maladie (20%). En revanche, un épissage alternatif de cet allèle en faveur du variant B pourrait limiter la capacité de compensation de ce dernier et ainsi favoriser le développement de la maladie. Par ailleurs, les souris mutées dans la queue cytoplasmique qui ne peuvent pas activer les voies non canoniques de BMPR2 mais qui conservent une voie SMAD normale développent une HTAP (Johnson et al., 2012), ce qui indique l'importance des

voies non canonique dans le développement de l'HTAP. C'est pourquoi nous avons exploré l'aspect du cytosquelette de la cellule endothéliale vasculaire pulmonaire. Par ailleurs, l'exon 12 de la protéine BMPRII a probablement de nombreux sites de liaisons à des protéines et pourrait affecter de nombreuses voies de signalisation en plus du cytosquelette. En effet, la partie cytoplasmique de BMPRII (exon 12) est capable d'interagir avec la protéine Tctex-1 (Machado et al., 2003). Cette protéine est appelée la dynéine cytoplasmique (ou *DYNLT1*) et a pour rôle de transporter des composants cellulaires le long des microtubules et jouerait un rôle dans la dimérisation du récepteur BMPRII à un de ces corécepteurs. De plus, lorsque le récepteur BMPRII dimérisé est activé, la dynéine cytoplasmique serait phosphorylée et ainsi irait interagir avec les effecteurs de la voie BMP tel que SMAD1 et p38. Au niveau vasculaire, cette protéine est exprimée par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Machado et al., 2003). De plus (Tang et al., 2002) ont démontré que le récepteur au TGF- β interagit avec la dynéine cytoplasmique afin de faciliter la régulation de sa voie de signalisation et permet la phosphorylation de JNK.

Dans la cadre d'HTAP muté *BMPRII*, un épissage dirigé vers le variant B pour l'allèle non muté, la dynéine perdrait un de ses interactants et ainsi se dirigerait préférentiellement vers une régulation positive du TGF- β . Ainsi, l'épissage alternatif de BMPRII vers le variant B, en plus de limiter la voie non canonique du BMP augmenterait la migration et la prolifération des cellules endothéliales vasculaires pulmonaires par la signalisation du TGF- β .

De manière similaire, (Dong et al., 2000) montrent que les microtubules sont importantes dans la régulation de la voie du TGF- β . En effet, les SMAD2 et SMAD3 et la SMAD régulatrice SMAD4 peuvent être séquestrées par les microtubules. La perte d'interaction de la dynéine avec le récepteur BMPR2 peut ainsi diriger la dynéine vers la voie du TGF- β et ainsi favoriser la signalisation dépendante des SMAD2/3.

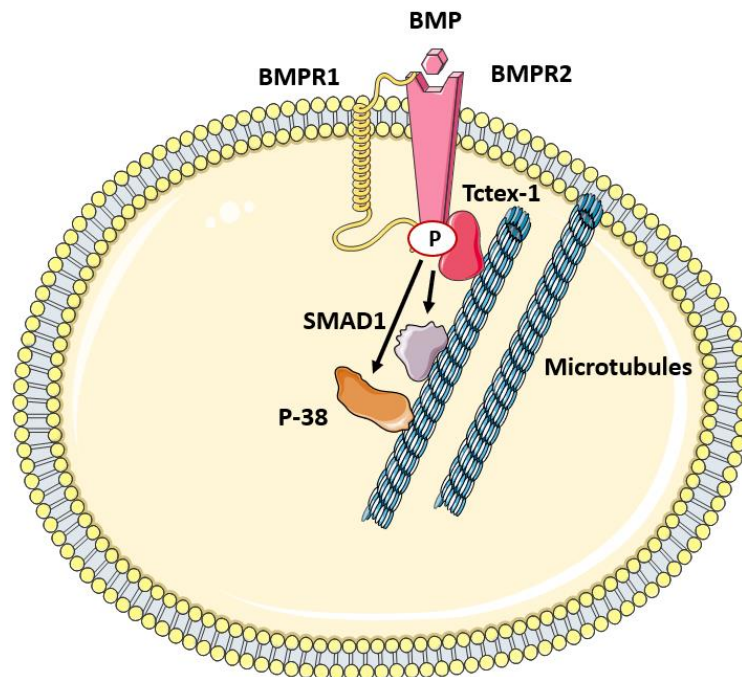


Figure 46 : Schéma de l'implication de la protéine Tctex-1 dans la signalisation de la voie du BMP. Lorsque la partie cytoplasmique est perdue, comme dans le variant B de BMPR2 ou lors de mutations de l'exon 12, cette voie est diminuée au profit de la voie du TGF- β .

Par ailleurs, il est toujours nécessaire d'identifier quel facteur est responsable de l'épissage alternatif de BMPR2. En effet, contrairement à (Cogan et al., 2012), le facteur d'épissage SRSF2 ne semble pas être responsable de la génération de la forme B du récepteur BMPRII. Cependant, nos expériences ne semblent pas montrer non plus que QKI soit responsable de l'épissage alternatif de BMPR2. Il est donc nécessaire d'identifier le facteur d'épissage, car une inhibition de ce facteur pourrait empêcher la génération du variant B au profit du variant A et ainsi favoriser la capacité de compensation lorsqu'un allèle est muté. Cependant, il faudra s'assurer que le facteur d'épissage identifié soit relativement spécifique de BMPR2 et ne modifie pas un trop grand nombre d'ARNm autres que BMPR2. Un autre message important de cette étude est que l'utilisation de cellules circulantes comme « reflet » des cellules vasculaires pulmonaires n'est pas toujours un bon moyen d'étude. Dans notre cas, l'étude

épigénétique a montré de différences de méthylation sur QKI. Cependant, la différence d'expression attendue n'était pas observable sur les cellules circulantes en qPCR (LTCD4⁺), alors qu'elle s'est avérée juste sur les cellules endothéliales pulmonaires.

6- Conclusion

En conclusion, nos résultats démontrent que les cellules endothéliales pulmonaires de patient atteint d'HTAP héritable (mutation *BMPR2*) présentent une plus grande expression du variant B et qu'elle est corrélée avec une plus faible phosphorylation de la cofiline. Cette dernière impacte la dynamique du cytosquelette de l'actine et donc la perméabilité de l'endothélium vasculaire ainsi que la migration de ces cellules. Nous montrons également, que les cellules circulantes ne sont pas forcément un bon substitut aux cellules vasculaires pulmonaires dans l'HTAP car ne reflètent pas toujours les altérations cellulaires et moléculaires retrouvées dans les cellules au centre de la pathologie (CE et CML). Or, du fait de l'importance du variant B dans le développement de la maladie, l'absence de cette forme d'épissage de *BMPRII* chez le rat et la souris peut expliquer la faible sévérité de la maladie chez les rongeurs. Afin de déterminer l'importance du variant B de *BMPR2* dans le développement de l'HTAP, il serait intéressant de créer un modèle de rongeur surexprimant le variant B. Enfin, il est nécessaire d'identifier le véritable facteur d'épissage de *BMPR2* car il pourrait être une cible thérapeutique intéressante afin de favoriser une forme A qui pourrait favoriser la compensation de la perte de l'allèle muté et ainsi réduire le développement de l'HTAP chez les patients mutés *BMPR2*.

7- Perspectives

Il est nécessaire de déterminer quel facteur est responsable de l'épissage alternatif de *BMPR2* dans les cellules endothéliales pulmonaires d'HTAPh. Cependant, il est connu que les facteurs d'épissage régulent de nombreux ARNm différents. C'est pourquoi il faut s'assurer de ne pas modifier la régulation transcriptionnelle d'une trop grande quantité de protéines importantes pour la cellule. De façon peut-être plus spécifique, une étude de (Kashima et al., 2016) a identifié le facteur fragile X mental retardation 1 protein (FRMP) comme étant responsable de la régulation transcriptionnelle négative de l'ARNm de *BMPR2*, et de l'isoforme long (A) en particulier, dans les neurones. Faisant de ce facteur un candidat intéressant à tester dans les

cellules endothéliales. Selon cette étude, une inhibition de ce facteur d'épissage pourrait augmenter l'expression du Variant A de BMPRII. Il serait également intéressant de créer un modèle de rongeur qui exprime le variant B de BMPRII et ainsi étudier son importance dans le développement de l'HTAP.

Enfin, l'étude de (Podkowa et al., 2010) démontre que la queue cytoplasmique de BMPRII est importante en qualité de protéine d'ancrage pour d'autres protéines intracellulaires telles que JNK. Il serait intéressant d'identifier si d'autres protéines intracellulaires requièrent la présence de la queue cytoplasmique de BMPRII afin d'assurer leur fonction. Ceci pourrait apporter de nouvelles hypothèses sur l'importance du rôle de l'expression de la forme courte de BMPRII dans le développement de l'HTAP.

8- Publication

1 **BMPR2 alternative splicing: Involvement of B variant in PAH development**

2 Manaud G^{1,2}, Chesné J, Hautefort A^{1,2}, Preussner J, Pullamsetti SS, Looso M, Girerd B^{1,2,3}, Deleuze JF,
3 Seeger W, Fadel E^{1,2,5}, Simonneau G^{1,2,3,4}, Montani D^{1,2,3,4}, Humbert M^{1,2,3,4}, Perros F^{1,2}

4 1. University Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

5 2. UMRS 999, INSERM and University Paris–Saclay, Laboratoire d'Excellence (LabEx) en Recherche
6 sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique (LERMIT), Centre Chirurgical Marie Lannelongue,
7 Le Plessis Robinson, France.

8 3. Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs
9 Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre,
10 France.

11 4. Department of Pulmonary diseases and Department of Pathology, Referral Center for Pulmonary
12 Hypertension, VU

13 5. Service de Chirurgie Thoracique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson,
14 France.

15 Corresponding authors:

16 Frédéric Perros, INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance,
17 F-92350 Le Plessis Robinson, France. Fax: (33) 1 40 94 25 22, Tel: (33) 1 40 94 25 33, e-mail:

18 frederic.perros@inserm.fr

19 **Authors' contributions**

20 Conception and design: FP, MH, DM, GM, BG, GS, EF, WS, JFD

21 Acquisition of data: GM, JC, AH, JP, SSP, ML

22 Analysis and interpretation: GM, FP, BG, DM, SSP

23 Drafting the manuscript for important intellectual content: GM, FP

24

25

26 Supports:

27 This work was funded the French National Research Agency (Agence Nationale de la Recherche, ANR;
28 grant: ANR-13-JSV1-0011-01) and by Pulmonary Vascular Research Institute (PVRI) Bmpr2
29 Research Grant supported by the Dinosaur Trust (to F.P.), and by DHU TORINO (Département
30 Hospitalo-Universitaire Thorax Innovation) and AP-HP. This work was also supported by INSERM,
31 Université Paris-Saclay and Hôpital Marie Lannelongue.

32 **ABSTRACT**

33 **Introduction:** Bone morphogenetic protein receptor 2 (*BMPR2*) gene mutations are the most common
34 cause of heritable pulmonary arterial hypertension (hPAH). However, only 20% of mutations carriers
35 develop clinical disease. We performed a DNA-methylation based epigenetic analysis on easily
36 accessible CD4⁺ T lymphocytes (LTCD4⁺) to identify potential low-penetrance PAH-susceptibility
37 genes. One locus was found strongly hypomethylated: RNA binding protein Quaking (QKI). In hPAH
38 patients, the QKI's CpG site is hypomethylated (<50%) as compared to apparently healthy mutation
39 carriers. This predicts a higher transcriptional expression of this gene. QKI is mainly required for the
40 regulation of pre-RNA splicing. It has been suggested that *BMPR2* VarB (truncated form) expression
41 may explain PAH penetrance in *BMPR2* mutation carriers. We hypothesized that QKI could favor the
42 pathological splicing of *BMPR2*.

43 **Methods:** The total mRNA expression of *BMPR2* and the variants A and B as well as of QKI was
44 quantified by qPCR on LTCD4⁺ from affected (hPAH) and non-affected (relatives) *BMPR2* mutation
45 carriers, iPAH patients and unrelated controls. We also performed this analysis on hPAH, IPAH and
46 control pulmonary endothelial cells (PEC) and pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC).
47 Moreover, we performed Western-blot analyses for the
48 p-cofilin and cofilin protein levels on BMP-stimulated PEC from hPAH, IPAH and controls.

49 **Results:** There was no difference in the relative expression of *BMPR2* VarA and B to total *BMPR2* and
50 QKI in LTCD4⁺ from all tested groups. However, *BMPR2* VarB was highly and specifically
51 overexpressed in the PEC from hPAH as compared to the IPAH and control PECs. Interestingly, we
52 found a strong negative correlation between the *BMPR2* VarB mRNA expression and the p-
53 cofilin/cofilin ratio. We are the first to show that *BMPR2* B variant is not expressed in rat and mouse.
54 The absence of the *BMPR2* B variant could explain the low functional impact of *BMPR2* mutations in
55 rodents.

56 **Conclusion:** *BMPR2* alternative splicing in PECs may be involved in the pathobiology of hPAH. This
57 splicing anomaly is not detected in circulating cells making blood lymphocytes poor surrogates of

58 pulmonary cells. BMPR2 VarB lacks BMP-activated cofilin-dependant downstream pathway and this
59 affects the actin dynamics in hPAH PECs.
60
61 **Keywords:** PAH, BMPR2, alternative splicing, F-Actine, endothelial permeability

62 **INTRODUCTION**

63 Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease characterized by an increase in mean
64 pulmonary pressure (greater or equal to 20 mmHg at rest), with a pulmonary vascular resistance greater
65 than 3 Wood units and a pulmonary capillary wedge pressure less or equal to 15 mmHg (Simonneau et
66 al., 2019). This disease affects the pulmonary vasculature, which is obstructed due to adverse vascular
67 remodeling leading to right ventricular failure and then to the death of the patient (Simonneau et al.,
68 2019). The classification of PAH includes idiopathic PAH (iPAH) and hereditary PAH (hPAH) where
69 70% of them are due to a germline autosomal dominant mutations in the *bone morphogenetic protein*
70 *receptor 2 (BMPR2)* gene which belongs to the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily
71 (Heldin and Moustakas, 2016). BMPR2 mutations are the main genetic risk factor for PAH development
72 (Machado et al., 2009). However, the penetrance is low (around 20%) which suggests that additional
73 triggers are necessary to the development of PAH or that the non-mutated allele of *BMPR2* can
74 compensate the mutated one (Gomez-Puerto et al., 2019; Long et al., 2013). BMPRII is a transmembrane
75 serine-threonine kinase receptor, which upon BMP binding mediates the activation of intracellular Smad
76 downstream effectors (canonical pathway) (Tzavlaki and Moustakas, 2020). BMPRII activation can also
77 induces non Smad signaling (non-canonical pathway) by activating several kinases (p38, JNK, MAP)
78 and small GTPases (Rho and Rac) (Moustakas and Heldin, 2005). Several mechanisms have been
79 described to partially explain the low penetrance of BMPR2 mutations in PAH. (Gomez-Puerto et al.,
80 2019) showed that autophagy promotes the receptor degradation, decreases the compensation and favors
81 the development of PAH. Also, the sexual dimorphism plays a role in the penetrance of *BMPR2* mutated
82 PAH where the female penetrance is about 42% and the male penetrance is about 14% (Evans et al.,
83 2016). The implication of alternative splicing of *BMPR2* in the hPAH penetrance which lead to the
84 expression of shorter variant (B) instead of the full-length variant (A) has not been investigated in
85 human, rat and mouse. We assumed that the expression of BMPR2 variant B of the non-mutated allele
86 can reduce his compensation capacity and affects both canonical and non-canonical pathway of BMPRII
87 and favors the development of PAH. To this aim, we performed qPCR and western blotting assays to
88 measure the expression of both BMPR2 splicing variants in human LTCD4⁺, PSMCs and P-ECs cells,

- 89 and in tissues from rats and mice. We also measure the effect of the over-expression of BMPR2 variant
- 90 B on the non-canonical pathway of BMPR2 after BMP-9 stimulation.

91 **METHODS**

92 ***DNA methylation***

93 Isolated genomic DNA from human LTCD4⁺ from 5 groups have been used for the DNA methylation
94 study: matched controls (n=20), iPAH (n=20), hPAH (n=20), BMPR2 relatives (n=20) and PVOD
95 (n=20). The DNA methylation profiling have been subcontracted tot the Centre National de Génotypage
96 (CNG) at Evry, France. The quantitative methylation status has been performed on more than 480 000
97 CpGs using the Illumina Infinium Human Methylation 450K BeadChip (Illumina Inc., CA, USA).

98 ***Real Time quantitative PCR (RT-qPCR)***

99 Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to standard procedures. RNA quantity and
100 quality was assessed using the Nanodrop-ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). One
101 microgram of total RNA was reverse-transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription Kit
102 (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 205311). Gene expression was quantified using RT-qPCR
103 following the standard protocol for ready-to-use SyBR Green gene expression assays (Anygenes, Paris,
104 France) on a StepOne + Real-Time PCR System (Life Technologies).

105 Predesigned probe sets used for the experiments on human LTCD4⁺ PASMCs and PECs were as follow
106 BMPR2 Variant A, HE-BMPR2A-200; BMPR2 Variant B, HE-BMPR2B-200 ; BMPR2, HE-BMPR2-
107 200 ; GAPDH, HE-GAPDH-200; B-Actin, HE-ACTB-200; QKI, HE-QKI-200 and SRSF2, HE-SRSF2-
108 200. For the experiments on Human, Rat and Mouse tissue, the samples used are described in the
109 supplementary table and the associated primer sets are described in the supplementary table. The PCRs
110 products were then analysed with an agarose gel electrophoresis, using Versadoc MP 100 System
111 (BioRad, Hercules, USA)

112 Results were analysed with the $2\Delta\Delta C_t$ method.

113 ***Western Blot analyses***

114 Preparation of protein samples from cultured cells and western blot analysis were performed as
115 previously described (Manaud et al., 2020). Human endothelial cells were starved for 3h with basal

116 MCD131 medium, following by a 30' treatment with 20 ng/ml of rHBMP-9 (R&D, Minneapolis, MN,
117 USA; cat. no. 3209-BP) in MCDB131 basal medium. The primary antibodies used in this study were as
118 follows: mouse monoclonal anti-cofilin (1:1000; Abcam; cat. no. ab54532), rabbit polyclonal anti-
119 cofilin phospho S3 (1:1000; Abcam; cat. no. ab12866), BMPRII (1:1000; Abcam; cat.no. ab130206)
120 and mouse monoclonal anti- β -actin antibodies (1:5000; Sigma; cat. no. A2228). ImageJ Software was
121 used to quantify the level of protein expression normalized to β -actin.

122 ***LTCD4+ isolation***

123 Peripheral blood (50 ml) was collected in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA).
124 The lymphocytes T CD4+ (LTCD4+) cells were isolated by negative selection. Blood was incubated
125 with RosetteSep Human CD4+ T cell enrichment cocktail (STEMCELL Technologies Inc) at 50 μ l/ml
126 of blood. LTCD4+ were then isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep, UNI-SEP
127 MAXI+ tubes, Abcys), at 1200g for 20 min at room temperature. LTCD4+ were washed in RPMI
128 medium then stored at -80°C until use.

129 ***P-ECs isolation and culture***

130 Human P-ECs were obtained by Dispase I digestion (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) of a 5-
131 cm³ lung tissue fragment left at 37°C overnight. The suspension was filtered, plated onto 0.1% gelatin-
132 coated wells, and grown in MCDB131 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with
133 10% fetal calf serum (FCS), 50 U/mL of penicillin/streptomycin, 4 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L
134 HEPES, 10 U/mL heparin, 1 μ g/mL human endothelial cell growth supplement, and 10 ng/mL vascular
135 endothelial growth factor (Promocell, Heidelberg, Germany). Immunomagnetic purification of P-ECs
136 was then performed with anti-PECAM-1 (CD31) monoclonal antibody-labeled DynaBeads (Dyna,
137 Biotech, Compiègne, France). Cells were used for the study between passages 3 and 6.

138 ***PASMC isolation and culture***

139 Human PASMC were obtained by using human pulmonary arteries explants (1cm) in DMEM
140 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% FBS, 50 U/mL of penicillin/streptomycin,

141 4 mmol/L L-glutamine, 25 mmol/L HEPES and Insulin (Promocell, Heidelberg, Germany). Cells were
142 used between passage 1 and 3.

143 ***F-actin immunofluorescent staining***

144 20'000 P-EC purchased from Lonza (used between passage 3 and 6) where seeded in 8 wells Labtek
145 which were previously coated with 0.1% gelatin. PEC's growth until reaching confluence. P-EC's where
146 then washed 3 times with PBS and incubate for 20min at 4°C with a solution containing 100Ug/ml of
147 L- α lysophosphatidylcholine (Sigma Aldrich), 10U of Phalloidin coupled with Alexa 568 and PFA
148 3.7%. DAPI staining has been performed after 3 PBS washes.

149 ***Cloning and transfection***

150 Cloning of BMPR2 Variant B and transfection into human lung pulmonary endothelial cells has been
151 performed by Anygenes™.

152 ***Statistical analysis***

153 Analysis was performed using GraphPad Software v6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).
154 All data were verified for normal distributions. Quantitatives variables are presented as means \pm standard
155 errors of the mean (SEMs). Data were analyzed using one way ANOVA tests. P values of less than 0.05
156 were considered statistically significant.

157 **RESULTS**

158 ***Epigenetics differences between BMPR2 PAH patients and non-diseased BMPR2 mutation carrier***

159 DNA methylation study on human LTCD4⁺ on controls (n= 20), hPAH (n= 20), iPAH (n=20), BMPR2
160 relatives (n= 17) and PVOD (n=9) have shown that QKI's promotor is significantly hypo-methylated
161 (>50%) in hPAH patients as compared to BMPR2 relatives. This predicts higher expression of this gene
162 in hPAH cells.

163 ***The expression of BMPR2 variants does not change in human LTCD4+ in all the tested groups***

164 To verify the above prediction, we performed several qPCRs to investigate the mRNA level of BMPR2
165 variants (A and B), BMPR2, QKI and SRSF2 one LTCD4⁺ that have been used for the epigenetic study.
166 For all these genes, the mRNA expression level from controls (n= 12), hPAH (n= 19), iPAH (n=19),
167 BMPR2 relatives (n= 17) and PVOD (n=9) show no significant differences between all groups.

168 ***The expression of BMPR2 variants does not change in human PSMCs in all the tested groups***

169 We performed several qPCRs to investigate the expression level of BMPR2 variants (A and B), BMPR2,
170 QKI and SRSF2 one primary cultured PSMC. For all these genes, the mRNA expression level from
171 controls (n= 7), hPAH (n= 6), iPAH (n=10), show no significant differences between all groups.

172 ***BMPR2 variant B is highly and specifically expressed in human PECs from hPAH patients***

173 We found that the mRNA expression level of the BMPR2 variant B is highly and significantly expressed
174 in hPAH (n=6) group compared to the control (n= 9) and iPAH (n= 8). Furthermore, the expression of
175 QKI is significantly decrease only in iPAH group compared to the others. The other tested genes
176 (BMPR2, BMPR2 variant A and SRSF2) don't show any significant changes in their mRNA relative
177 expression level.

178 ***BMPR2 variant B expression is linked to a decrease in the phosphorylation of cofilin and may induce***
179 ***a perturbation of cytoskeleton dynamics.***

180 To evaluate the effect of the loss of intracellular part of BMPR2, we performed western blot analysis
181 and evaluate the phosphorylation level of cofilin. All the groups show a phosphorylation of cofilin,
182 however, the hPAH P-ECs (n=5) present a significant decrease in phosphorylation of cofilin compared

183 to iPAH (n=7) and Controls (n=5). Also, the phosphorylation level of cofilin is strongly correlated to
184 the BMPR2 variant B expression only within the hPAH patients ($r^2 = 0.8570$; $p=0.024$) and suggests
185 that the increase in BMPR2 variant B observed in hPAH is responsible for the loss of phosphorylation
186 of cofilin. The non-phosphorylation of cofilin is responsible for the regeneration of pre-existing actin
187 filaments. These results suggest that in P-ECs from hPAH patient exert a higher activity and may disturb
188 the actin dynamics and affect the endothelial barrier permeability.

189 ***BMPR2 variant B leads to actin disorganization in hPECs***

190 Phalloidin staining in human lung pulmonary endothelial cells transfected with BMPR2 B variant is
191 reduced compared to lung pulmonary endothelial cells transfected with empty vector.

192 ***BMPR2 variant B is not expressed in both mouse and rat***

193 In both rat and mouse the BMPR2 variant A (total length) is highly expressed in pulmonary samples
194 and in other tested organs. In human, the BMPR2 variant B is expressed from 8.93 to 7.46 less than the
195 BMPR2 variant A in lungs and other organs. Very interestingly, no expression of BMPR2 variant B has
196 been detected in both rats and mouse samples.

197 **DISCUSSION**

198 In this study we analyzed the expression of *BMPR2* variants in human lung vascular cells (PECs &
199 PASMCS) as well as freshly isolated human immune cells (LTCD4+). This study had 3 major findings,
200 as follows. First, we show that PECs from hPAH patients specifically and significantly express a higher
201 level of the *BMPR2* variant B compared to iPAH and control patients. This overexpression has not been
202 found in PSMCs and LTCD4+ and show that circulating immune cells are poor surrogates of
203 pulmonary vascular cells. Secondly, the increase in *BMPR2* variant B expression prevents the activation
204 of LIMK1 leading to a decreased in the phosphorylation of its target, cofilin. The non-phosphorylated
205 form of cofilin corresponds to this activated form, and active cofilin is responsible for the regeneration
206 of F-actin filaments (Ostrowska and Moraczewska, 2017). The overexpression of *BMPR2* B variants in
207 control pulmonary endothelial cells induces a change in the distribution of actin stress fibers and may
208 be implicated in the endothelial cell barrier dysfunction (Schnoor et al., 2017) and could contribute to
209 the development of PAH (Dasgupta et al., 2017). Thirdly, we are the first to show that neither rat nor
210 mouse express *BMPR2* B variant. This absence of *BMPR2* splicing could explain the small functional
211 effects of *BMPR2* mutations in rodents (Ryan et al., 2013). This study shows that a *BMPR2* splicing
212 promoting the short form of *BMPR-II* devoid of its non-canonical functions, could promote the
213 occurrence of PAH in the context of a *BMPR-II* pathway already weakened by the mutation of one of
214 the alleles of this predisposition gene. We first identified through the methylation epigenetic based study
215 that *QKI* promotor is hypomethylated in hPAH patients compared to *BMPR2* relatives which suggest a
216 higher expression of this gene in the diseased state. *QKI* is RNA-binding protein described as an
217 important actor in central nervous system and especially in axon myelinization (Lavon et al., 2019; Lu
218 et al., 2003) and oligodendrocytes differentiation (Thangaraj et al., 2017). However, recent papers show
219 that *QKI* is also involved in alternative splicing in vascular cells (Caines et al., 2019; Cochrane et al.,
220 2017; van der Veer et al., 2013). Our hypothesis was that *QKI* could be responsible for regulation of
221 *BMPR2* mRNA alternative splicing. However, we were not able to see any differences in *QKI*
222 expression in the analyzed cell types (PECs, PSMCs and LTCD4+) from the tested diseased and non-
223 diseased groups. Those experiments entail that *QKI* is probably not the factor responsible for *BMPR2*
224 splicing. We decided to check the expression of the splicing factor described by (Cogan et al., 2012):

225 SFSR2. Unfortunately, we also did not find any change in SRSF2 expression in all the cell types and
226 patients tested. So, it is necessary to identify which factor is responsible of the regulation of BMPR2
227 mRNA splicing. A recent study by (Kashima et al., 2016) shows that BMPR2 mRNA is a target of
228 translational regulation of FMRP. Indeed, they described that FMRP is a negative regulator of BMPR2
229 variant A protein expression in some populations of neurons. They also showed that BMPR2 short form
230 (variant B) expression inhibits BMPR2 full length form (variant A). This result is relevant to the
231 hypothesis that BMPR2 B variant expression could reduce the compensation capacity of the non-
232 mutated allele in BMPR2 mutated PAH patients and/or that the signaling pathways controlled by the
233 cytoplasmic tail of BMPRII, lost in the short form of the protein, are critical for pulmonary endothelial
234 homeostasis. Another study by (Amsalem et al., 2016) shows that it exists a differential BMPRII
235 endocytosis depending of the alternatively spliced variants. Indeed, they show that BMPR2 B variant is
236 less degraded due to a decrease in its endocytosis as compared to BMPR2 variant A. It means that the
237 BMPR2 short form can stay longer at the plasma membrane and its expression affects the balance of
238 activation of canonical and non-canonical signals induced by BMPs. Finally, a study by (Podkova et
239 al., 2010) shows that BMPR2 long form is required for the activation of JNK pathway and microtubules
240 stabilization in neurons. They show that BMPR2 short form expression represses the activation of JNK
241 pathway because JNK binds to the cytoplasmic tail of BMPR2 to regulate microtubules stabilization.
242 This is the only study that shows that BMPR2 cytoplasmic tail has a scaffolding function. We can
243 speculate that many proteins use BMPR2 cytoplasmic tail as a scaffolding protein and it may regulate
244 many others signaling pathways.

245

246 **CONCLUSION**

247 To conclude, our results demonstrate that pulmonary endothelial cells from hPAH patients express a
248 higher level of BMPR2 variant B and it correlated with a lower cofilin phosphorylation. This affects
249 actin dynamics and may induce an endothelial cell barrier dysfunction. We also show that circulating
250 blood cells are a poor surrogate of lung vascular cells because they don't reflect the cellular and
251 molecular alterations that we found in pulmonary vascular cells. Due to the potential importance of
252 BMPR2 B variant in the development of the disease, the absence of BMPR2 B variant in rodents may
253 explain the low severity of the disease in those animals. In order to determine the importance of
254 BMPR2 B variant in the development of PAH it would be interesting to create an animal model which
255 expresses BMPR2 B variant. Moreover, identifying the BMPR2 splicing factor would allow its
256 targeting in order to increase the expression of BMPR2 A variant. This therapeutic option may
257 increase the compensation capacity of the non-mutated allele in order to reduce the progression of
258 PAH in BMPR2 mutated patients.

- 299 Ostrowska, Z., and Moraczewska, J. (2017). Cofilin - a protein controlling dynamics of actin
300 filaments. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* 71, 339–351.
- 301 Puigdevall, P., Piccari, L., Blanco, I., Barberà, J.A., Geiger, D., Badenas, C., Milà, M., Castelo, R.,
302 and Madrigal, I. (2019). Genetic linkage analysis of a large family identifies FIGN as a candidate
303 modulator of reduced penetrance in heritable pulmonary arterial hypertension. *J. Med. Genet.* 56, 481–
304 490.
- 305 Ryan, J.J., Marsboom, G., and Archer, S.L. (2013). Rodent models of group 1 pulmonary
306 hypertension. *Handb Exp Pharmacol* 218, 105–149.
- 307 Schnoor, M., García Ponce, A., Vadillo, E., Pelayo, R., Rossaint, J., and Zarbock, A. (2017). Actin
308 dynamics in the regulation of endothelial barrier functions and neutrophil recruitment during
309 endotoxemia and sepsis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 74, 1985–1997.
- 310 Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams,
311 P.G., and Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of
312 pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 53.
- 313 Thangaraj, M.P., Furber, K.L., Gan, J.K., Ji, S., Sobchishin, L., Doucette, J.R., and Nazarali, A.J.
314 (2017). RNA-binding Protein Quaking Stabilizes Sirt2 mRNA during Oligodendroglial
315 Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 292, 5166–5182.
- 316 Tzavlaki, K., and Moustakas, A. (2020). TGF- β Signaling. *Biomolecules* 10.
- 317 van der Veer, E.P., de Bruin, R.G., Kraaijeveld, A.O., de Vries, M.R., Bot, I., Pera, T., Segers, F.M.,
318 Trompet, S., van Gils, J.M., Roeten, M.K., et al. (2013). Quaking, an RNA-binding protein, is a
319 critical regulator of vascular smooth muscle cell phenotype. *Circulation Research* 113, 1065–1075.
- 320

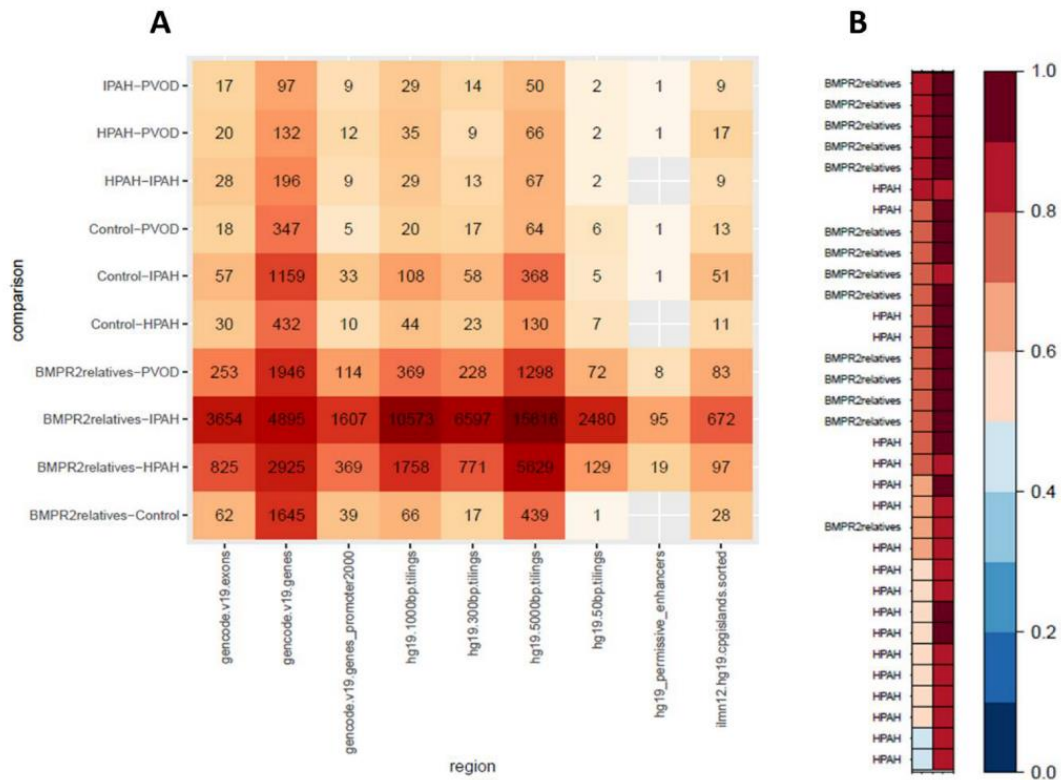


Figure 1

322

323 **Figure 1: DNA methylation analysis in human LTCD4+**

324 **A**, Comparison of differential genome methylation of LTCD4+ in IPAH (n=20), hPAH (n=20), PVOD
 325 (n=20), BMPR2 relatives (n=20) and controls (n=20) patients using Illumina Infinium Human
 326 Methylation 450K BeadChip (Illumina Inc., CA, USA). **B**, Relative methylation level of QKI's
 327 promotor of LTCD4+ in hPAH (n=19) and BMPR2 relatives (n=14) patients.

Human LTCD4+

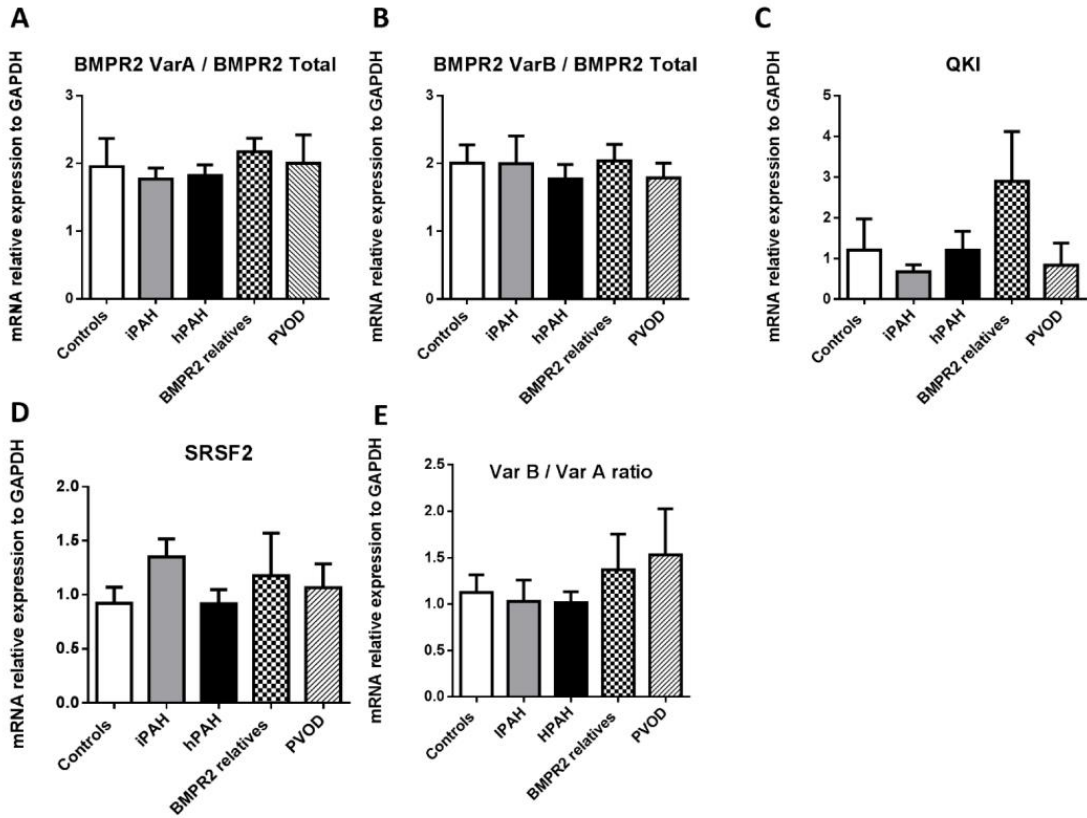


Figure 2

328

329 **Figure 2: BMPR2 VarB is not differentially expressed in human LTCD4+ from hPAH, iPAH, PVOD,**
 330 **BMPR2 relatives and control patients**

331 mRNA relative expression of **A**, BMPR2 VarA (normalized to total BMPR2), **B**, BMPR2 VarB
 332 (normalized to total BMPR2), **C**, QKI, **D**, and SRSF2. **E**, mRNA expression of level of BMPR2 VarB
 333 normalized by BMPR2 VarA. All the expression were normalized to GAPDH.

Human PASMC

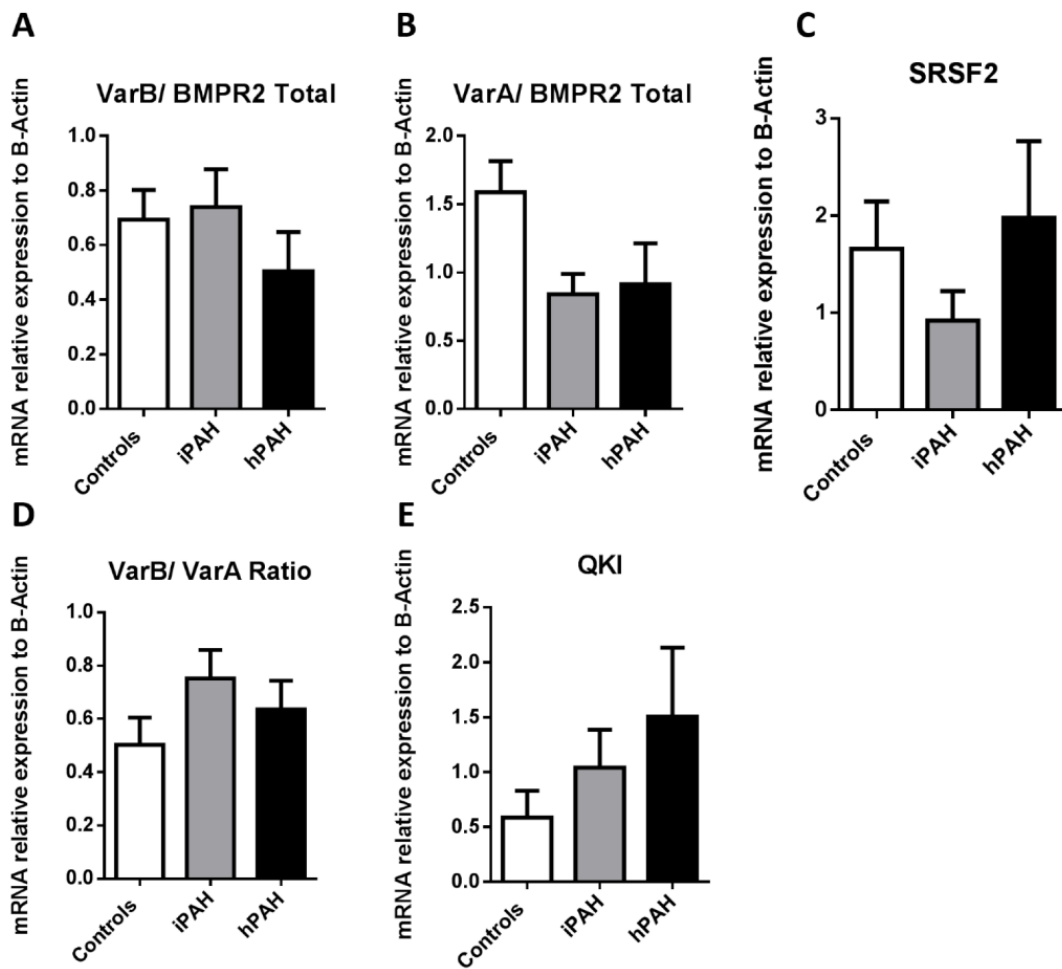


Figure 3

334

335 *Figure 3: BMPR2 VarB is not differentially expressed in human PASMC from hPAH, iPAH and*
 336 *control patients*

337 mRNA relative expression of **A**, BMPR2 VarA (normalized to total BMPR2), **B**, BMPR2 VarB

338 (normalized to total BMPR2), **C**, QKI, **D**, and SRSF2. **E**, mRNA expression of level of BMPR2 VarB

339 normalized by BMPR2 VarA. All the expression were normalized to β -Actin.

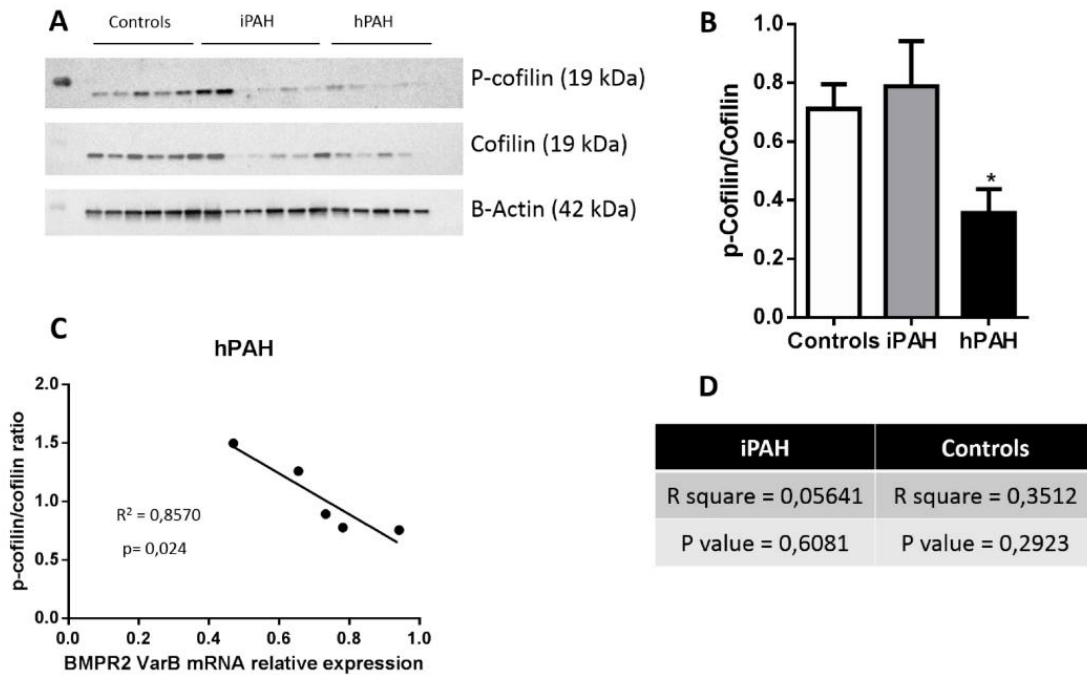
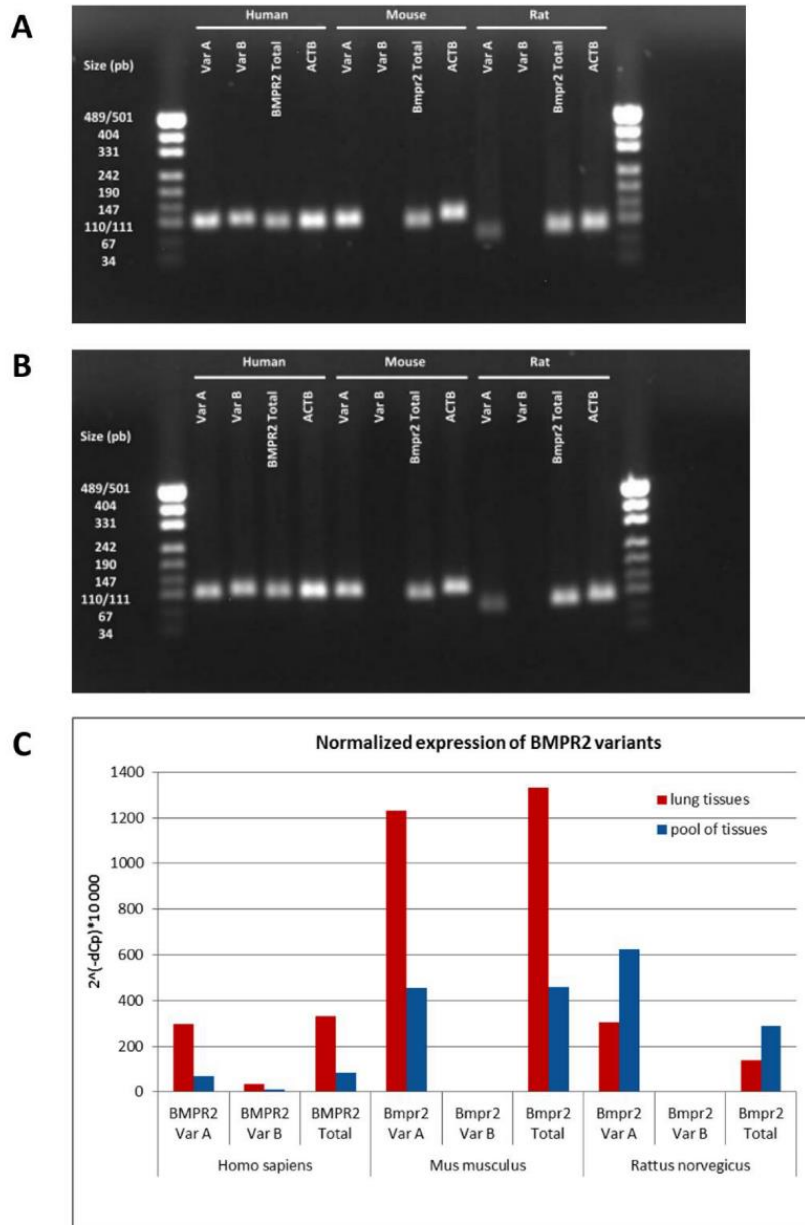


Figure 5

348

349 **Figure 5: The p-cofilin/cofilin ratio is specifically decreased in hPAH patients and strongly inversely**
 350 **correlated with the BMPR2 VarB expression.**

351 **A**, Western Blot of p-cofilin and cofilin expression in PAEC from iPAH (n= 7), hPAH (n=5) and control
 352 (n=5) patients. β -Actin was used as loading control. **B**, Quantification of p-cofilin / cofilin ratio from
 353 the Western Blot. **C**, Correlation graph between p-cofilin/cofilin ratio and BMPR2 VarB mRNA
 354 expression level in human hPAH PAEC. **D**, Table of correlation values between p-cofilin/cofilin ratio
 355 and BMPR2 VarB mRNA expression level in human iPAH and control PAEC.



356

357 **Figure 6: BMPR2 VarB is expressed in human tissues, but not in mouse and rat tissues.**

358 **A**, Electrophoresis of PCR products of BMPR2 VarA, BMPR2 VarB, BMPR2 and ACTB from lungs

359 samples in human, mouse and rat. **B**, Electrophoresis of PCR products of BMPR2 VarA, BMPR2 VarB,

360 BMPR2 and ACTB from several tissues samples in human, mouse and rat. **C**, Graph of normalized

361 expression of BMPR2 VarA and B in human, mouse and rat tissues.

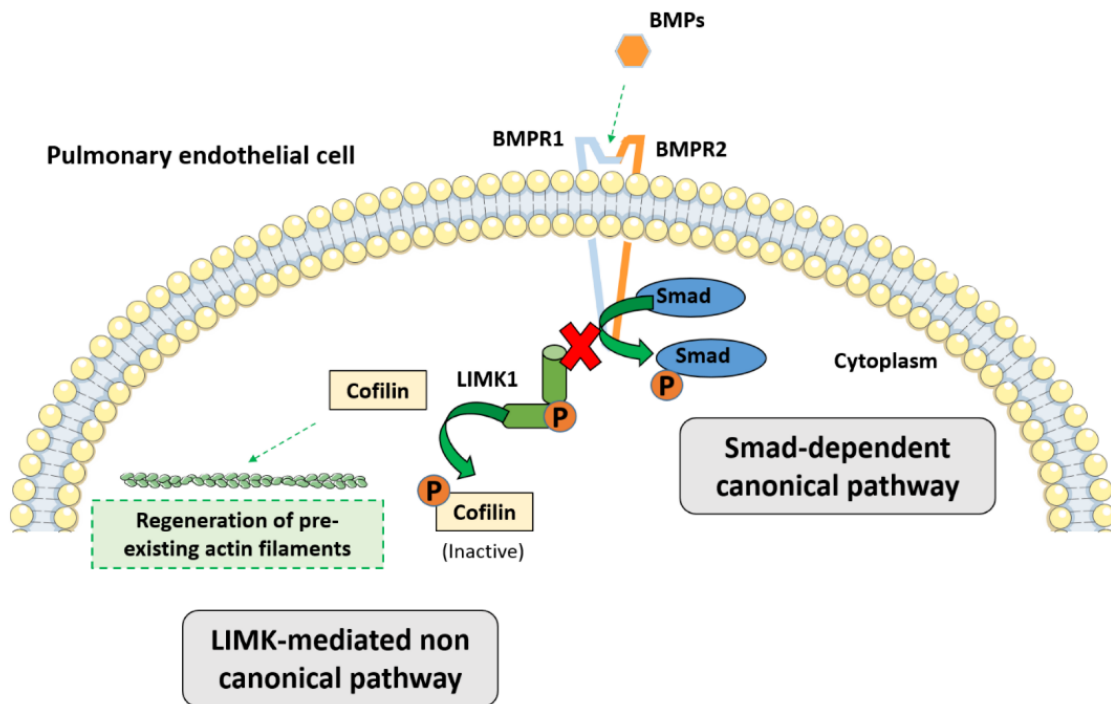


Figure 7

363

364 *Figure 7: Schema of BMPR2 variant B overexpression consequences in hPECs.*

365 The expression of BMPR2 B variant negatively affects the non-canonical LIMK1 dependent pathway.

366 LIMK1 is not activated when a BMP bind to the BMP receptor (BMPR2) and induces a decrease in

367 cofilin phosphorylation. The non-phosphorylated form a cofilin induces an increase in the regeneration

368 of actin-filaments. In pulmonary endothelial cells, it induces a change in the F-actin stress fiber

369 distribution and can lead to a dysfunction in endothelial cell barrier within the vessel and can participate

370 to the development of PAH.

Name	Type	Proportion in each cDNA pool
<i>Homo sapiens</i>		
691927 / 692254 / 638735 / 638536	4 healthy lung tissues	1/11
A549	Pulmonary adenocarcinoma	1/11
PBMC	5 healthy patients	1/11
Placenta	*	1/11
SKMEL-28 / A375 / BLM / M10 / C8161	Melanoma	1/11
MDA-MB-231	Mamalian adenocarcinoma	1/11
HTK	Cornea fibroblasts	1/11
PANC1 / BxPC3 / MIA PACA2	Pancreatic Carcinoma	1/11
DU145 / PC3	Prostatic adenocarcinoma	1/11
HEPG2 / HUH-7	Hepatocarcinoma	1/11
U87MG	Neuroblastoma	1/11
<i>Mus musculus (strains : BALB/c Rag-/- yc-/- et C57BL/6)</i>		
Lungs	*	1/24
Kidney	*	1/24
Spleen	*	1/24
Muscle	*	1/24
Liver	*	1/24
Heart	*	1/24
Brain	*	1/24
Cerebellum	*	1/24
Spinal Chord	*	1/24
Ovary	*	1/24
Thymus	*	1/24
PBMC	*	1/24
<i>Rattus norvegicus</i>		
Lungs	*	1/8
Kidney	*	1/8
Spleen	*	1/8
Muscle	*	1/8
Liver	*	1/8
Heart	*	1/8
Brain	*	1/8
Cerebellum	*	1/8

Legend: Samples used for the Bmpr2 expression level analysis in lungs

Supp Figure 1

372

373 *Supplemental Table 1: List of the tissues and samples used for the study of the detection of Bmpr2*
 374 *variants in human, mouse and rat.*

Species	Gene Name	RefSeq	Symbol	Chr. Location	For. Primer Location	Rev. Primer Location	Amplicon size (bp)	Specificity	lot #
Homo sapiens	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_001204.6	BMPR2	2q33-q34	exon 7	exon 8	98	BMPR2	1H-BMPR2
		NM_001204.6	BMPR2 variant A	2q33-q34	exon 12	exon 12	105	BMPR2 variant A	2H-BMPR2 varA
		*	BMPR2 variant B	2q33-q34	exon 11	Jonction 11-13	112	BMPR2 variant B	2H-BMPR2 varB
	actin, beta	NM_001101.3	ACTB	7p22	exon 6	exon 6	106	ACTB	4H-ACTB
Mus musculus	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_007561.4	Bmpr2	1 C1.3; 1	exon 4	exon 5	103	Bmpr2	1M-Bmpr2
		NM_007561.4	Bmpr2 variant A	1 C1.3; 1	exon 11	exon 12	108	Bmpr2 variant A	1M-Bmpr2 varA
		*	Bmpr2 variant B	1 C1.3; 1	exon 11	exon 13	165	Bmpr2 variant B	2M-Bmpr2 varB
	actin, beta	NM_007393.3	Actb	5 G2; 5 81.8 cM	exon 4	exon 5	118	Actb	1M-Actb
Rattus norvegicus	bone morphogenetic protein receptor type 2	NM_080407	Bmpr2	9q31	exon 3	exon 4	86	Bmpr2	1R-Bmpr2
		NM_080407	Bmpr2 variant A	9q31	exon 11	exon 12	70	Bmpr2 variant A	1R-Bmpr2 varA
		*	Bmpr2 variant B	9q31	exon 11	exon 13	160	Bmpr2 variant B	2R-Bmpr2 varB
	actin, beta	NM_031144.3	Actb	12p11	exon 4	exon 5	91	Actb	1R-Actb

Supp Figure 2

375

376 *Supplemental Table 2: List and details of the primers used for the study of the detection of BMPR2*
377 *variants in human, mouse and rat.*

Pos	Gene Name	Sample	Species	Cp	dCp	2 [^] (-dCp)	2 [^] (-dCp) *10000
B2	BMPR2 Var A	healthy lungs pool	Human	21.88	5.08	0.0295643	295.64
B3	BMPR2 Var B	healthy lungs pool	Human	25.04	8.24	0.0033076	33.08
B4	BMPR2 total	healthy lungs pool	Human	21.72	4.92	0.03303181	330.32
B5	ACTB	healthy lungs pool	Human	16.8	*	*	*
B8	Bmpr2 Var A	lungs pool	Mouse	19.03	3.02	0.12327909	1232.79
B9	Bmpr2 Var B	lungs pool	Mouse	> 35			0
B10	Bmpr2 total	lungs pool	Mouse	18.92	2.91	0.13304627	1330.46
B11	ACTB	lungs pool	Mouse	16.01	*	*	*
B14	Bmpr2 Var A	lungs pool	Rat	21.96	5.03	0.03060688	306.07
B15	Bmpr2 Var B	lungs pool	Rat	> 35			0
B16	Bmpr2 total	lungs pool	Rat	23.1	6.17	0.01388817	138.88
B17	ACTB	lungs pool	Rat	16.93	*	*	*
D2	BMPR2 Var A	all tissues pool	Human	21.23	7.21	0.0067542	67.54
D3	BMPR2 Var B	all tissues pool	Human	24.13	10.11	0.00090487	9.05
D4	BMPR2 total	all tissues pool	Human	20.89	6.87	0.00854917	85.49
D5	ACTB	all tissues pool	Human	14.02	*	*	*
D8	Bmpr2 Var A	all tissues pool	Mouse	19.72	4.46	0.04543664	454.37
D9	Bmpr2 Var B	all tissues pool	Mouse	> 35			0
D10	Bmpr2 total	all tissues pool	Mouse	19.7	4.44	0.04607091	460.71
D11	ACTB	all tissues pool	Mouse	15.26	*	*	*
D14	Bmpr2 Var A	all tissues pool	Rat	19.09	4	0.0625	625.00
D15	Bmpr2 Var B	all tissues pool	Rat	> 35			0
D16	Bmpr2 total	all tissues pool	Rat	20.2	5.11	0.02895588	289.56
D17	ACTB	all tissues pool	Rat	15.09	*	*	*

Supp Figure 3

378

379 *Supplemental Table 3: PCR results of the expression level of BMPR2 variants in human, mouse*
380 *and rat.*

Human LTCD4+

Gene name	Stability value	Standard error		Best gene	GAPDH
ActB	0,959	0,094			
B2M	0,521	0,074			
GAPDH	0,207	0,102			
GusB	0,962	0,095			
RPS17	0,898	0,091			

Supp Figure 4

381

382 *Supplemental Table 4: Results of the NormFinder analysis for the selection of the best house-*
383 *keeping gene for the mRNA expression level experiment in human LTCD4+.*

Conclusion générale

L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie rare et sévère caractérisée par une élévation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-dessus de 20mmHg au repos. Cette élévation de pression est due à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires à la suite d'un remodelage progressif des artères pulmonaires. Ce remodelage résulte d'une altération de différents processus cellulaires et moléculaires tels que la prolifération, l'apoptose, la balance vasoconstriction/vasodilatation, l'inflammation et la thrombose *in situ*. Malgré la complexité de la maladie, les mécanismes physiopathologiques sont de mieux en mieux connus pour les patients d'HTAP mutés sur *BMPR2*. Les traitements actuels de l'HTAP ciblent le dialogue entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses et permettent une augmentation de la survie des patients. Cependant dans l'HTAP avec atteinte veineuse pulmonaire prédominante (MVO), les mécanismes physiopathologiques sont encore très peu connus et il n'existe aucun traitement approuvé, même symptomatique, pour ces patients.

C'est pourquoi mon premier projet a porté sur l'étude des mécanismes physiopathologiques de l'unique modèle toxique de maladie veino-occlusive pulmonaire : Le modèle de rat exposé à la Mitomycine-C. Nous avons mis en évidence une altération dans l'activation de plusieurs processus cellulaires communs entre le modèle animal et la maladie humaine tels que : l'apoptose, l'inflammation et la prolifération. Nous sommes les premiers à avoir montré qu'il existe une connexion moléculaire entre GCN2 et la voie du BMP.

Le second projet a porté sur l'étude de la pénétrance des mutations *BMPRII*. En effet, seulement 20% des porteurs de mutations *BMPRII* vont développer une HTAP. En étudiant les différences entre les porteurs sains et les porteurs malades nous avons mis en évidence l'importance de l'expression du variant B de *BMPRII* dans le développement de la maladie. Ce dernier est responsable d'une modification de la dynamique du cytosquelette d'actine et il pourrait être impliqué dans la régulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, dont certaines importantes pour le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. Nous sommes également les premiers à montrer que les rongeurs (rat et souris) n'expriment pas le

variant B, ce qui pourrait expliquer la faible pénétrance et la faible sévérité de l'HTAP dans les modèles génétiquement modifiés pour ce gène.

Références Bibliographiques

-A-

Adnot, S., Houssaini, A., Abid, S., Marcos, E., and Amsellem, V. (2013). Serotonin transporter and serotonin receptors. *Handb Exp Pharmacol* 218, 365–380.

Archer, S.L., Gomberg-Maitland, M., Maitland, M.L., Rich, S., Garcia, J.G.N., and Weir, E.K. (2008). Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294, H570–H578.

Archer, S.L., Fang, Y.-H., Ryan, J.J., and Piao, L. (2013). Metabolism and bioenergetics in the right ventricle and pulmonary vasculature in pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 3, 144–152.

Archer Stephen L., Weir E. Kenneth, and Wilkins Martin R. (2010). Basic Science of Pulmonary Arterial Hypertension for Clinicians. *Circulation* 121, 2045–2066.

Arciniegas, E., Servin, M., Argüello, C., and Mota, M. (1989). Development of the aorta in the chick embryo: structural and ultrastructural study. *Atherosclerosis* 76, 219–235.

Arciniegas, E., Ponce, L., Hartt, Y., Graterol, A., and Carlini, R.G. (2000). Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat. Rec.* 258, 47–57.

Arciniegas, E., Neves, C.Y., Carrillo, L.M., Zambrano, E.A., and Ramírez, R. (2005). Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 12, 193–200.

Arciniegas, E., Frid, M.G., Douglas, I.S., and Stenmark, K.R. (2007). Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293, L1-8.

Arends, S.J., Damoiseaux, J.G.M.C., Duijvestijn, A.M., Debrus-Palmans, L., Vroomen, M., Boomars, K.A., Brunner-La Rocca, H.-P., Reutelingsperger, C.P.M., Cohen Tervaert, J.W., and van Paassen, P. (2013). Immunoglobulin G anti-endothelial cell antibodies: inducers of endothelial cell apoptosis in pulmonary arterial hypertension? *Clin. Exp. Immunol.* 174, 433–440.

Arita, Y., Sakata, Y., Sudo, T., Maeda, T., Matsuoka, K., Tamai, K., Higuchi, K., Shioyama, W., Nakaoka, Y., Kanakura, Y., et al. (2010). The efficacy of tocilizumab in a patient with pulmonary arterial hypertension associated with Castleman's disease. *Heart Vessels* 25, 444–447.

Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.

Asherson, R.A. (1990). Pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 17, 414–415.

Assaad, A.M., Kawut, S.M., Arcasoy, S.M., Rosenzweig, E.B., Wilt, J.S., Sonett, J.R., and Borczuk, A.C. (2007). Platelet-derived growth factor is increased in pulmonary capillary hemangiomas. *Chest* 131, 850–855.

Assad, T.R., and Hemnes, A.R. (2015). Metabolic Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 17, 20.

Atkinson, C., Stewart, S., Upton, P.D., Machado, R., Thomson, J.R., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2002). Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105, 1672–1678.

Austin, E.D., Phillips, J.A., Cogan, J.D., Hamid, R., Yu, C., Stanton, K.C., Phillips, C.A., Wheeler, L.A., Robbins, I.M., Newman, J.H., et al. (2009a). Truncating and missense BMP2 mutations differentially affect the severity of heritable pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 10, 87.

Austin, E.D., Cogan, J.D., West, J.D., Hedges, L.K., Hamid, R., Dawson, E.P., Wheeler, L.A., Parl, F.F., Loyd, J.E., and Phillips, J.A. (2009b). Alterations in oestrogen metabolism: implications for higher penetrance of familial pulmonary arterial hypertension in females. *European Respiratory Journal* 34, 1093–1099.

Austin, E.D., Ma, L., LeDuc, C., Berman Rosenzweig, E., Borczuk, A., Phillips, J.A., Palomero, T., Sumazin, P., Kim, H.R., Talati, M.H., et al. (2012). Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet* 5, 336–343.

Avecilla, V. (2019). Effect of Transcriptional Regulator ID3 on Pulmonary Arterial Hypertension and Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Int J Vasc Med* 2019, 2123906.

-B-

Balabanian, K., Foussat, A., Dorfmueller, P., Durand-Gasselino, I., Capel, F., Bouchet-Delbos, L., Portier, A., Marfaing-Koka, A., Krzysiek, R., Rimaniol, A.-C., et al. (2002). CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 1419–1425.

Barnett, C.F., and Machado, R.F. (2006). Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 2, 411–422.

Benisty, J.I., McLaughlin, V.V., Landzberg, M.J., Rich, J.D., Newburger, J.W., Rich, S., and Folkman, J. (2004). Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 126, 1255–1261.

Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K. (2000). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.* 221, 249–258.

Bertero, T., Oldham, W.M., Cottrill, K.A., Pisano, S., Vanderpool, R.R., Yu, Q., Zhao, J., Tai, Y., Tang, Y., Zhang, Y.-Y., et al. (2016). Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* *126*, 3313–3335.

Bogaard, H.J., Abe, K., Vonk Noordegraaf, A., and Voelkel, N.F. (2009). The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* *135*, 794–804.

Bogatcheva, N.V., Garcia, J.G.N., and Verin, A.D. (2002). Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry Mosc.* *67*, 75–84.

Bohnen, M.S., Ma, L., Zhu, N., Qi, H., McClenaghan, C., Gonzaga-Jauregui, C., Dewey, F.E., Overton, J.D., Reid, J.G., Shuldiner, A.R., et al. (2018). Loss-of-Function ABCC8 Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Genom Precis Med* *11*, e002087.

Bonnet, S., Michelakis, E.D., Porter, C.J., Andrade-Navarro, M.A., Thébaud, B., Bonnet, S., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., McMurtry, M.S., et al. (2006). An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* *113*, 2630–2641.

Bordenave Jennifer, Tu Ly, Berrebeh Nihel, Thuillet Raphaël, Cumont Amélie, Le Vely Benjamin, Fadel Elie, Nadaud Sophie, Savale Laurent, Humbert Marc, et al. (2020). Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Pericytes to the Blood Vessel Remodeling in Pulmonary Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *40*, 766–782.

Bouallegue, A., Simo Cheyou, E.R., Anand-Srivastava, M.B., and Srivastava, A.K. (2013). ET-1-induced growth promoting responses involving ERK1/2 and PKB signaling and Egr-1 expression are mediated by Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase-II in vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* *54*, 428–435.

Bressollette, E., Dupuis, J., Bonan, R., Doucet, S., Cernacek, P., and Tardif, J.C. (2001). Intravascular ultrasound assessment of pulmonary vascular disease in patients with pulmonary hypertension. *Chest* *120*, 809–815.

Bristow, M.R., and Quaife, R.A. (2015). The adrenergic system in pulmonary arterial hypertension: bench to bedside (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* *5*, 415–423.

van der Bruggen, C.E., Happé, C.M., Dorfmueller, P., Trip, P., Spruijt, O.A., Rol, N., Hoevenaars, F.P., Houweling, A.C., Girerd, B., Marcus, J.T., et al. (2016). Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2 Mutation in Pulmonary Arterial Hypertension: A View on the Right Ventricle. *Circulation* *133*, 1747–1760.

Burton, V.J., Ciucan, L.I., Holmes, A.M., Rodman, D.M., Walker, C., and Budd, D.C. (2011). Bone morphogenetic protein receptor II regulates pulmonary artery endothelial cell barrier function. *Blood* *117*, 333–341.

Cabrera, N., Duquesne, A., Desjonquères, M., Larbre, J.-P., Lega, J.-C., Fabien, N., and Belot, A. (2016). Tocilizumab in the treatment of mixed connective tissue disease and overlap syndrome in children. *RMD Open* 2, e000271.

Caines, R., Cochrane, A., Kelaini, S., Vila-Gonzalez, M., Yang, C., Eleftheriadou, M., Moez, A., Stitt, A.W., Zeng, L., Grieve, D.J., et al. (2019). The RNA-binding protein QKI controls alternative splicing in vascular cells, producing an effective model for therapy. *Journal of Cell Science* 132.

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83.

Castilho, B.A., Shanmugam, R., Silva, R.C., Ramesh, R., Himme, B.M., and Sattlegger, E. (2014). Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1948–1968.

Caughey, G.E., Cleland, L.G., Gamble, J.R., and James, M.J. (2001). Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. Role of thromboxane A₂. *J. Biol. Chem.* 276, 37839–37845.

Chang, Y.-T., Tseng, C.-N., Tannenberg, P., Eriksson, L., Yuan, K., de Jesus Perez, V.A., Lundberg, J., Lengquist, M., Botusan, I.R., Catrina, S.-B., et al. (2015). Perlecan heparan sulfate deficiency impairs pulmonary vascular development and attenuates hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.* 107, 20–31.

Chen, X., Austin, E.D., Talati, M., Fessel, J.P., Farber-Eger, E.H., Brittain, E.L., Hemnes, A.R., Loyd, J.E., and West, J. (2017). Oestrogen inhibition reverses pulmonary arterial hypertension and associated metabolic defects. *European Respiratory Journal* 50.

Chester, A.H., and Yacoub, M.H. (2014). The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract* 2014, 62–78.

Chester, A.H., Yacoub, M.H., and Moncada, S. Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. *Glob Cardiol Sci Pract* 2017.

Christman, B.W., McPherson, C.D., Newman, J.H., King, G.A., Bernard, G.R., Groves, B.M., and Loyd, J.E. (1992). An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 327, 70–75.

Cogan, J., Austin, E., Hedges, L., Womack, B., West, J., Loyd, J., and Hamid, R. (2012). Role of BMPR2 alternative splicing in heritable pulmonary arterial hypertension penetrance. *Circulation* 126, 1907–1916.

Cogan, J.D., Pauciulo, M.W., Batchman, A.P., Prince, M.A., Robbins, I.M., Hedges, L.K., Stanton, K.C., Wheeler, L.A., Phillips, J.A., Loyd, J.E., et al. (2006). High frequency of BMPR2

exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *174*, 590–598.

Coons, J.C., Pogue, K., Kolodziej, A.R., Hirsch, G.A., and George, M.P. (2019). Pulmonary Arterial Hypertension: a Pharmacotherapeutic Update. *Curr Cardiol Rep* *21*, 141.

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

-D-

Dai, Z., and Zhao, Y.-Y. (2017). Discovery of a murine model of clinical PAH: Mission impossible? *Trends in Cardiovascular Medicine* *27*, 229–236.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* *109*, 1953–1961.

Délot, E.C., Bahamonde, M.E., Zhao, M., and Lyons, K.M. (2003). BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart. *Development* *130*, 209–220.

Deramaudt, B.M., Braunstein, S., Remy, P., and Abraham, N.G. (1998). Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* *68*, 121–127.

DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E., VanMunsteren, J.C., Mironov, V., Markwald, R.R., and Gittenberger-de Groot, A.C. (1997). Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ. Res.* *80*, 444–451.

Deshane, J., Chen, S., Caballero, S., Grochot-Przeczek, A., Was, H., Li Calzi, S., Lach, R., Hock, T.D., Chen, B., Hill-Kapturczak, N., et al. (2007). Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* *204*, 605–618.

Dey, S., Sayers, C.M., Verginadis, I.I., Lehman, S.L., Cheng, Y., Cerniglia, G.J., Tuttle, S.W., Feldman, M.D., Zhang, P.J.L., Fuchs, S.Y., et al. (2015). ATF4-dependent induction of heme oxygenase 1 prevents anoikis and promotes metastasis. *J. Clin. Invest.* *125*, 2592–2608.

Docherty, C.K., Harvey, K.Y., Mair, K.M., Griffin, S., Denver, N., and MacLean, M.R. (2018). The Role of Sex in the Pathophysiology of Pulmonary Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1065*, 511–528.

Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Feng, X.H., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol. Cell* *5*, 27–34.

Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3493–3511.

Dorfmüller, P., Zarka, V., Durand-Gasselín, I., Monti, G., Balabanian, K., Garcia, G., Capron, F., Coulomb-Lherminé, A., Marfaing-Koka, A., Simonneau, G., et al. (2002). Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165, 534–539.

Dweik, R.A. (2007). The lung in the balance: arginine, methylated arginines, and nitric oxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292, L15–17.

Dyer, L.A., Pi, X., and Patterson, C. (2014). The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 472–480.

-E-

Eddahibi, S., and Adnot, S. (2006). The serotonin pathway in pulmonary hypertension. *Arch Mal Coeur Vaiss* 99, 621–625.

Evans, J.D.W., Girerd, B., Montani, D., Wang, X.-J., Galiè, N., Austin, E.D., Elliott, G., Asano, K., Grünig, E., Yan, Y., et al. (2016). BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med* 4, 129–137.

Eyries, M., Montani, D., Girerd, B., Perret, C., Leroy, A., Lonjou, C., Chelghoum, N., Coulet, F., Bonnet, D., Dorfmueller, P., et al. (2014). EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat. Genet.* 46, 65–69.

Eyries, M., Montani, D., Girerd, B., Favrolt, N., Riou, M., Faivre, L., Manaud, G., Perros, F., Gräf, S., Morrell, N.W., et al. (2020). Familial pulmonary arterial hypertension by KDR heterozygous loss of function. *Eur. Respir. J.* 55.

-F-

Fayyaz, A.U., Edwards, W.D., Maleszewski, J.J., Konik, E.A., DuBrock, H.M., Borlaug, B.A., Frantz, R.P., Jenkins, S.M., and Redfield, M.M. (2018). Global Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension Associated With Heart Failure and Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Circulation* 137, 1796–1810.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581–611.

Fessel, J.P., Chen, X., Frump, A., Gladson, S., Blackwell, T., Kang, C., Johnson, J., Loyd, J.E., Hemnes, A., Austin, E., et al. (2013). Interaction between bone morphogenetic protein receptor type 2 and estrogenic compounds in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 3, 564–577.

Folestad, E., Kunath, A., and Wågsäter, D. (2018). PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Molecular Aspects of Medicine* 62, 1–11.

Foletta, V.C., Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J., Bernard, O., et al. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.* 162, 1089–1098.

Frid, M.G., Dempsey, E.C., Durmowicz, A.G., and Stenmark, K.R. (1997). Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 1203–1209.

-G-

Galiè, N., and Branzi, A. (2005). Pulmonary arterial hypertension: therapeutic algorithm. *Ital Heart J* *6*, 856–860.

Galiè, N., Manes, A., Negro, L., Palazzini, M., Bacchi-Reggiani, M.L., and Branzi, A. (2009). A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* *30*, 394–403.

Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., et al. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* *69*, 177.

Galis, Z.S., and Khatri, J.J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.* *90*, 251–262.

Gamell, C., Osses, N., Bartrons, R., Rückle, T., Camps, M., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2008). BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J. Cell. Sci.* *121*, 3960–3970.

Garcia-Rivas, G., Jerjes-Sánchez, C., Rodriguez, D., Garcia-Pelaez, J., and Trevino, V. (2017). A systematic review of genetic mutations in pulmonary arterial hypertension. *BMC Med. Genet.* *18*, 82.

Ghofrani, H.A., Seeger, W., and Grimminger, F. (2005). Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* *353*, 1412–1413.

Ghosh, S., Gupta, M., Xu, W., Mavrikakis, D.A., Janocha, A.J., Comhair, S.A.A., Haque, M.M., Stuehr, D.J., Yu, J., Polgar, P., et al. (2016). Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *310*, L1199-1205.

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

Girerd, B., Montani, D., Coulet, F., Sztrymf, B., Yaici, A., Jaïs, X., Tregouet, D., Reis, A., Drouin-Garraud, V., Fraise, A., et al. (2010). Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *181*, 851–861.

Girerd, B., Coulet, F., Jaïs, X., Eyries, M., Van Der Bruggen, C., De Man, F., Houweling, A., Dorfmueller, P., Savale, L., Sitbon, O., et al. (2015). Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest* *147*, 1385–1394.

Girerd, B., Montani, D., Jaïs, X., Eyries, M., Yaici, A., Sztrymf, B., Savale, L., Parent, F., Coulet, F., Godinas, L., et al. (2016). Genetic counselling in a national referral centre for pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 47, 541–552.

Gomez-Puerto, M.C., van Zuijen, I., Huang, C.J., Szulcek, R., Pan, X., van Dinther, M.A., Kurakula, K., Wiesmeijer, C.C., Goumans, M.-J., Bogaard, H.-J., et al. (2019). Autophagy contributes to BMP type 2 receptor degradation and development of pulmonary arterial hypertension. *J. Pathol.* 249, 356–367.

Gräf, S., Haimel, M., Bleda, M., Hadinnapola, C., Southgate, L., Li, W., Hodgson, J., Liu, B., Salmon, R.M., Southwood, M., et al. (2018). Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nature Communications* 9, 1–16.

Guignabert, C., Phan, C., Seferian, A., Huertas, A., Tu, L., Thuillet, R., Sattler, C., Le Hires, M., Tamura, Y., Jutant, E.-M., et al. (2016). Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 126, 3207–3218.

Guignabert, C., Bailly, S., and Humbert, M. (2017). Restoring BMPRII functions in pulmonary arterial hypertension: opportunities, challenges and limitations. *Expert Opin. Ther. Targets* 21, 181–190.

Günther, S., Perros, F., Rautou, P.-E., Girerd, B., Ghigna, M.-R., Cazals-Hatem, D., Lau, E.M., Dorfmueller, P., Sitbon, O., Valla, D.C., et al. (2019). Understanding the Similarities and Differences between Hepatic and Pulmonary Venous Occlusive Disease. *Am. J. Pathol.* 189, 1159–1175.

Guo, D., Murdoch, C.E., Liu, T., Qu, J., Jiao, S., Wang, Y., Wang, W., and Chen, X. (2018). Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. *Front Pharmacol* 9, 428.

-H-

Hagen, T. (2012). Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1 : The Balance Tips (Hindawi).

Halank, M., Hoepfer, M.M., Ghofrani, H.-A., Meyer, F.J., Stähler, G., Behr, J., Ewert, R., Fletcher, M., Colorado, P., Nikkho, S., et al. (2017). Riociguat for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: Results from a phase II long-term extension study. *Respir Med* 128, 50–56.

Hamid, R., Cogan, J.D., Hedges, L.K., Austin, E., Phillips, J.A., Newman, J.H., and Loyd, J.E. (2009). Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPRII allele. *Hum. Mutat.* 30, 649–654.

Han, B., Copeland, C.A., Kawano, Y., Rosenzweig, E.B., Austin, E.D., Shahmirzadi, L., Tang, S., Raghunathan, K., Chung, W.K., and Kenworthy, A.K. (2016). Characterization of a caveolin-1 mutation associated with both pulmonary arterial hypertension and congenital generalized lipodystrophy. *Traffic* 17, 1297–1312.

Hansen, B.S., Vaughan, M.H., and Wang, L. (1972). Reversible inhibition by histidinol of protein synthesis in human cells at the activation of histidine. *J. Biol. Chem.* *247*, 3854–3857.

Hashimoto-Kataoka, T., Hosen, N., Sonobe, T., Arita, Y., Yasui, T., Masaki, T., Minami, M., Inagaki, T., Miyagawa, S., Sawa, Y., et al. (2015). Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, E2677-2686.

Hautefort Aurélie, Mendes-Ferreira Pedro, Sabourin Jessica, Manaud Grégoire, Bertero Thomas, Rucker-Martin Catherine, Riou Marianne, Adão Rui, Manoury Boris, Lambert Mélanie, et al. (2019). Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* *139*, 932–948.

Hernández-Sánchez, J., Harlow, L., Church, C., Gaine, S., Knightbridge, E., Bunclark, K., Gor, D., Bedding, A., Morrell, N., Corris, P., et al. (2018). Clinical trial protocol for TRANSFORM-UK: A therapeutic open-label study of tocilizumab in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* *8*, 2045893217735820.

Hida, K., Maishi, N., Annan, D.A., and Hida, Y. (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* *19*.

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

Hirsch, H.H., Yakhontova, K., Lu, M., and Manzetti, J. (2016). BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *American Journal of Transplantation* *16*, 821–832.

Hodgson, J., Swietlik, E.M., Salmon, R.M., Hadinnapola, C., Nikolic, I., Wharton, J., Guo, J., Liley, J., Haimel, M., Bleda, M., et al. (2020). Characterization of GDF2 Mutations and Levels of BMP9 and BMP10 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *201*, 575–585.

Hoepfer, M.M., Barst, R.J., Bourge, R.C., Feldman, J., Frost, A.E., Galié, N., Gómez-Sánchez, M.A., Grimminger, F., Grünig, E., Hassoun, P.M., et al. (2013). Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* *127*, 1128–1138.

Hood Katie Y., Mair Kirsty M., Harvey Adam P., Montezano Augusto C., Touyz Rhian M., and MacLean Margaret R. (2017). Serotonin Signaling Through the 5-HT1B Receptor and NADPH Oxidase 1 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *37*, 1361–1370.

Hopper, R.K., Moonen, J.-R.A.J., Diebold, I., Cao, A., Rhodes, C.J., Tojais, N.F., Hennigs, J.K., Gu, M., Wang, L., and Rabinovitch, M. (2016). In Pulmonary Arterial Hypertension, Reduced BMPR2 Promotes Endothelial-to-Mesenchymal Transition via HMGA1 and Its Target Slug. *Circulation* *133*, 1783–1794.

Huang, Z., Wang, D., Ihida-Stansbury, K., Jones, P.L., and Martin, J.F. (2009). Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 2791–2801.

Huertas, A., Perros, F., Tu, L., Cohen-Kaminsky, S., Montani, D., Dorfmueller, P., Guignabert, C., and Humbert, M. (2014). Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay. *Circulation* *129*, 1332–1340.

Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sitbon, O., Portier, A., Grangeot-Keros, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., and Emilie, D. (1995). Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *151*, 1628–1631.

Humbert, M., Sitbon, O., and Simonneau, G. (2004). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* *351*, 1425–1436.

Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.-F., Chabot, F., et al. (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *173*, 1023–1030.

Humbert, M., Lau, E.M.T., Montani, D., Jaïs, X., Sitbon, O., and Simonneau, G. (2014). Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* *130*, 2189–2208.

-J-

Jacobson, B.S. (2000). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: A model for blood vessel growth and enlargement. *Am. J. Pathol.* *156*, 737–742.

Jasmin, J.F., Lucas, M., Cernacek, P., and Dupuis, J. (2001). Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* *103*, 314–318.

Johnson, J.A., Hemnes, A.R., Perrien, D.S., Schuster, M., Robinson, L.J., Gladson, S., Loibner, H., Bai, S., Blackwell, T.R., Tada, Y., et al. (2012). Cytoskeletal defects in Bmpr2-associated pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *302*, L474-484.

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

Jones, P.L., Cowan, K.N., and Rabinovitch, M. (1997). Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am. J. Pathol.* *150*, 1349–1360.

Jonigk, D., Golpon, H., Bockmeyer, C.L., Maegel, L., Hoeper, M.M., Gottlieb, J., Nickel, N., Hussein, K., Maus, U., Lehmann, U., et al. (2011). Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. *Am. J. Pathol.* *179*, 167–179.

Ju, H., Zou, R., Venema, V.J., and Venema, R.C. (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 18522–18525.

-K-

Kashima, R., Roy, S., Ascano, M., Martinez-Cerdeno, V., Ariza-Torres, J., Kim, S., Louie, J., Lu, Y., Leyton, P., Bloch, K.D., et al. (2016). Augmented noncanonical BMP type II receptor signaling mediates the synaptic abnormality of fragile X syndrome. *Science Signaling* 9, ra58.

Katzel, J.A., Fanucchi, M.P., and Li, Z. (2009). Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2, 2.

Kawut, S.M., Assaad, A.M., Arcasoy, S.M., Rosenzweig, E.B., Sonett, J.R., and Borczuk, A.C. (2005). Pulmonary capillary hemangiomatosis: results of gene expression analysis. *Chest* 128, 575S-5766S.

Kazerounian, S., and Lawler, J. (2018). Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells. *J Cell Commun Signal* 12, 171–179.

Kentera, D., Susić, D., Veljković, V., Tucaković, G., and Koko, V. (1988). Pulmonary artery pressure in rats with hereditary platelet function defect. *Respiration* 54, 110–114.

Kerstjens-Frederikse, W.S., Bongers, E.M.H.F., Roofthoof, M.T.R., Leter, E.M., Douwes, J.M., Van Dijk, A., Vonk-Noordegraaf, A., Dijk-Bos, K.K., Hoefsloot, L.H., Hoendermis, E.S., et al. (2013). TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J. Med. Genet.* 50, 500–506.

Khan, Y.M., Kirkham, P., Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2014). Brd4 is essential for IL-1 β -induced inflammation in human airway epithelial cells. *PLoS ONE* 9, e95051.

Kim, M.-J., Park, S.Y., Chang, H.R., Jung, E.Y., Munkhjargal, A., Lim, J.-S., Lee, M.-S., and Kim, Y. (2017). Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2. *BMB Rep* 50, 308–317.

Klinger, J.R., Oudiz, R.J., Spence, R., Despain, D., and Dufton, C. (2011). Long-term pulmonary hemodynamic effects of ambrisentan in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Cardiol.* 108, 302–307.

Kradin, R., Matsubara, O., and Mark, E.J. (2005). Endothelial nitric oxide synthase expression in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Exp. Mol. Pathol.* 79, 194–197.

Kruk, J.S., Vasefi, M.S., Heikkila, J.J., and Beazely, M.A. (2013). Reactive oxygen species are required for 5-HT-induced transactivation of neuronal platelet-derived growth factor and TrkB receptors, but not for ERK1/2 activation. *PLoS ONE* 8, e77027.

- Lai, Y.-C., Potoka, K.C., Champion, H.C., Mora, A.L., and Gladwin, M.T. (2014). Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ. Res.* *115*, 115–130.
- Langleben, D., Christman, B.W., Barst, R.J., Dias, V.C., Galiè, N., Higenbottam, T.W., Kneussl, M., Korducki, L., Naeije, R., Riedel, A., et al. (2002). Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am. Heart J.* *143*, E4.
- Larkin, E.K., Newman, J.H., Austin, E.D., Hemnes, A.R., Wheeler, L., Robbins, I.M., West, J.D., Phillips, J.A., Hamid, R., and Loyd, J.E. (2012). Longitudinal analysis casts doubt on the presence of genetic anticipation in heritable pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *186*, 892–896.
- Lathen, C., Zhang, Y., Chow, J., Singh, M., Lin, G., Nigam, V., Ashraf, Y.A., Yuan, J.X., Robbins, I.M., and Thistlethwaite, P.A. (2014). ERG-APLNR axis controls pulmonary venule endothelial proliferation in pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation* *130*, 1179–1191.
- Lau, E.M.T., Giannoulatou, E., Celermajer, D.S., and Humbert, M. (2017). Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* *14*, 603–614.
- Le Ribez, H., Capuano, V., Girerd, B., Humbert, M., Montani, D., and Antigny, F. (2020). Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Biomolecules* *10*.
- Levy, M., Eyries, M., Szezepanski, I., Ladouceur, M., Nadaud, S., Bonnet, D., and Soubrier, F. (2016). Genetic analyses in a cohort of children with pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* *48*, 1118–1126.
- Li, C., Liu, P., Song, R., Zhang, Y., Lei, S., and Wu, S. (2017). Immune cells and autoantibodies in pulmonary arterial hypertension. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* *49*, 1047–1057.
- Lian, T.-Y., Jiang, X., and Jing, Z.-C. (2017). Riociguat: a soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug Des Devel Ther* *11*, 1195–1207.
- Liao, W., Feng, L., Zheng, J., and Chen, D. (2010). Deciphering mechanisms controlling placental artery endothelial cell migration stimulated by vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* *151*, 3432–3444.
- Lindegaard Pedersen, M., Krüger, M., Grimm, D., Infanger, M., and Wehland, M. (2019). The prostacyclin analogue treprostinil in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*
- Long, L., Ormiston, M.L., Yang, X., Southwood, M., Gräf, S., Machado, R.D., Mueller, M., Kinzel, B., Yung, L.M., Wilkinson, J.M., et al. (2015). Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* *21*, 777–785.

Lyle, M.A., Davis, J.P., and Brozovich, F.V. (2017). Regulation of Pulmonary Vascular Smooth Muscle Contractility in Pulmonary Arterial Hypertension: Implications for Therapy. *Front Physiol* 8, 614.

-M-

Ma, L., and Chung, W.K. (2017). The role of genetics in pulmonary arterial hypertension. *J. Pathol.* 241, 273–280.

Ma, L., Roman-Campos, D., Austin, E.D., Eyries, M., Sampson, K.S., Soubrier, F., Germain, M., Trégouët, D.-A., Borczuk, A., Rosenzweig, E.B., et al. (2013). A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 369, 351–361.

Machado, R.D., Rudarakanchana, N., Atkinson, C., Flanagan, J.A., Harrison, R., Morrell, N.W., and Trembath, R.C. (2003). Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 12, 3277–3286.

MacLean, M.R., Sweeney, G., Baird, M., McCulloch, K.M., Houslay, M., and Morecroft, I. (1996). 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 119, 917–930.

Mandel, J., Mark, E.J., and Hales, C.A. (2000). Pulmonary veno-occlusive disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1964–1973.

Maruyama, H., Dewachter, C., Belhaj, A., Rondelet, B., Sakai, S., Rimmelink, M., Vachier, J.-L., Naeije, R., and Dewachter, L. (2015). Endothelin-Bone morphogenetic protein type 2 receptor interaction induces pulmonary artery smooth muscle cell hyperplasia in pulmonary arterial hypertension. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 468–478.

Mathai, S.C., and Hassoun, P.M. (2012). Pulmonary arterial hypertension in connective tissue diseases. *Heart Fail Clin* 8, 413–425.

McDonald, J., Wooderchak-Donahue, W., VanSant Webb, C., Whitehead, K., Stevenson, D.A., and Bayrak-Toydemir, P. (2015). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* 6, 1.

McLaughlin, V.V., Shah, S.J., Souza, R., and Humbert, M. (2015). Management of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 65, 1976–1997.

McLean, P.G., and Coupar, I.M. (1996). Characterisation of a postjunctional 5-HT₇-like and a prejunctional 5-HT₃ receptor mediating contraction of rat isolated jejunum. *Eur. J. Pharmacol.* 312, 215–225.

Medici, D., Potenta, S., and Kalluri, R. (2011). Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem. J.* 437, 515–520.

Montani, D., Günther, S., Dorfmüller, P., Perros, F., Girerd, B., Garcia, G., Jaïs, X., Savale, L., Artaud-Macari, E., Price, L.C., et al. (2013). Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 8, 1–28.

Montani, D., Lau, E.M., Dorfmüller, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., Perros, F., Nossent, E., Garcia, G., Parent, F., et al. (2016a). Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur. Respir. J.* 47, 1518–1534.

Montani, D., Lau, E.M., Dorfmüller, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., Perros, F., Nossent, E., Garcia, G., Parent, F., et al. (2016b). Pulmonary veno-occlusive disease. *European Respiratory Journal* 47, 1518–1534.

Morecroft, I., Loughlin, L., Nilsen, M., Colston, J., Dempsie, Y., Sheward, J., Harmar, A., and MacLean, M.R. (2005). Functional interactions between 5-hydroxytryptamine receptors and the serotonin transporter in pulmonary arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 539–548.

Morrell, N.W., Danilov, S.M., Satyan, K.B., Morris, K.G., and Stenmark, K.R. (1997). Right ventricular angiotensin converting enzyme activity and expression is increased during hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research* 34, 393–403.

Morrell, N.W., Adnot, S., Archer, S.L., Dupuis, J., Jones, P.L., MacLean, M.R., McMurtry, I.F., Stenmark, K.R., Thistlethwaite, P.A., Weissmann, N., et al. (2009). Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, S20-31.

Mumby, S., Gambaryan, N., Meng, C., Perros, F., Humbert, M., Wort, S.J., and Adcock, I.M. (2017). Bromodomain and extra-terminal protein mimic JQ1 decreases inflammation in human vascular endothelial cells: Implications for pulmonary arterial hypertension. *Respirology (Carlton, Vic.)* 22, 157–164.

Murata, T., Kinoshita, K., Hori, M., Kuwahara, M., Tsubone, H., Karaki, H., and Ozaki, H. (2005). Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2335–2342.

Murray, F., MacLean, M.R., and Pyne, N.J. (2002). Increased expression of the cGMP-inhibited cAMP-specific (PDE3) and cGMP binding cGMP-specific (PDE5) phosphodiesterases in models of pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 137, 1187–1194.

-N-

Naeije, R., and Vachiéry, J.L. (2001). Medical therapy of pulmonary hypertension. Conventional therapies. *Clin. Chest Med.* 22, 517–527.

Nasim, M.T., Ogo, T., Ahmed, M., Randall, R., Chowdhury, H.M., Snape, K.M., Bradshaw, T.Y., Southgate, L., Lee, G.J., Jackson, I., et al. (2011). Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum. Mutat.* 32, 1385–1389.

Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002). Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol. Biol. Cell* 13, 3055–3063.

Nishimura, T., Faul, J.L., Berry, G.J., Vaszar, L.T., Qiu, D., Pearl, R.G., and Kao, P.N. (2002). Simvastatin Attenuates Smooth Muscle Neointimal Proliferation and Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1403–1408.

Noel, Z.R., Kido, K., and Macaulay, T.E. (2017). Selexipag for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am J Health Syst Pharm* 74, 1135–1141.

Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R., and Henriques-Coelho, T. (2015). Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm Pharmacol Ther* 35, 8–16.

Nossent, E.J., Antigny, F., Montani, D., Bogaard, H.J., Ghigna, M.R., Lambert, M., Thomas de Montpréville, V., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., et al. (2018). Pulmonary vascular remodeling patterns and expression of general control nonderepressible 2 (GCN2) in pulmonary veno-occlusive disease. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 37, 647–655.

de Nucci, G., Gryglewski, R.J., Warner, T.D., and Vane, J.R. (1988). Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2334–2338.

-O-

Oka Masahiko, Homma Noriyuki, Taraseviciene-Stewart Laimute, Morris Kenneth G., Kraskauskas Donatas, Burns Nana, Voelkel Norbert F., and McMurtry Ivan F. (2007). Rho Kinase–Mediated Vasoconstriction Is Important in Severe Occlusive Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circulation Research* 100, 923–929.

Okada, K., Tanaka, Y., Bernstein, M., Zhang, W., Patterson, G.A., and Botney, M.D. (1997). Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* 151, 1019–1025.

Olschewski, A., Veale, E.L., Nagy, B.M., Nagaraj, C., Kwapiszewska, G., Antigny, F., Lambert, M., Humbert, M., Czirják, G., Enyedi, P., et al. (2017). TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: from cell biology to clinical implications. *Eur. Respir. J.* 50.

-P-

Pai, V.B., and Nahata, M.C. (2000). Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 22, 263–302.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., and Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Reports* 17, 1374–1395.

Pei, Y., Ma, P., Wang, X., Zhang, W., Zhang, X., Zheng, P., Yan, L., Xu, Q., and Dai, G. (2011). Rosuvastatin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension via regulation of Akt/eNOS signaling and asymmetric dimethylarginine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 666, 165–172.

Perros, F., Dorfmüller, P., Souza, R., Durand-Gasselín, I., Mussot, S., Mazmanian, M., Hervé, P., Emilie, D., Simonneau, G., and Humbert, M. (2007a). Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* *29*, 462–468.

Perros, F., Dorfmüller, P., Souza, R., Durand-Gasselín, I., Godot, V., Capel, F., Adnot, S., Eddahibi, S., Mazmanian, M., Fadel, E., et al. (2007b). Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* *29*, 937–943.

Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselín, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., et al. (2008). Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *178*, 81–88.

Perros, F., Dorfmüller, P., Montani, D., Hammad, H., Waelput, W., Girerd, B., Raymond, N., Mercier, O., Mussot, S., Cohen-Kaminsky, S., et al. (2012). Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *185*, 311–321.

Perros, F., Cohen-Kaminsky, S., Gambaryan, N., Girerd, B., Raymond, N., Klingelschmitt, I., Huertas, A., Mercier, O., Fadel, E., Simonneau, G., et al. (2013). Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *187*, 189–196.

Perros, F., Günther, S., Ranchoux, B., Godinas, L., Antigny, F., Chaumais, M.-C., Dorfmüller, P., Hautefort, A., Raymond, N., Savale, L., et al. (2015). Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation* *132*, 834–847.

Perros Frédéric, Günther Sven, Ranchoux Benoit, Godinas Laurent, Antigny Fabrice, Chaumais Marie-Camille, Dorfmüller Peter, Hautefort Aurélie, Raymond Nicolas, Savale Laurent, et al. (2015). Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease. *Circulation* *132*, 834–847.

Peverelli, E., Catalano, R., Giardino, E., Treppiedi, D., Morelli, V., Ronchi, C.L., Vaczlavik, A., Fusco, N., Ferrero, S., Bertherat, J., et al. (2017). Cofilin is a cAMP effector in mediating actin cytoskeleton reorganization and steroidogenesis in mouse and human adrenocortical tumor cells. *Cancer Lett.* *406*, 54–63.

Philp, C.J., Siebeke, I., Clements, D., Miller, S., Habgood, A., John, A.E., Navaratnam, V., Hubbard, R.B., Jenkins, G., and Johnson, S.R. (2018). Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *58*, 594–603.

Piao, L., Marsboom, G., and Archer, S.L. (2010). Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* *88*, 1011–1020.

Piao, L., Fang, Y.-H., Parikh, K., Ryan, J.J., Toth, P.T., and Archer, S.L. (2013). Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *J. Mol. Med.* *91*, 1185–1197.

Piera-Velazquez, S., and Jimenez, S.A. (2012). Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5, S7.

Podkowa, M., Zhao, X., Chow, C.-W., Coffey, E.T., Davis, R.J., and Attisano, L. (2010). Microtubule stabilization by bone morphogenetic protein receptor-mediated scaffolding of c-Jun N-terminal kinase promotes dendrite formation. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2241–2250.

Pousada, G., Baloira, A., Vilariño, C., Cifrian, J.M., and Valverde, D. (2014). Novel mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 genes and hemodynamic parameters in patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE* 9, e100261.

Pozeg Zlatko I., Michelakis Evangelos D., McMurtry M. Sean, Thébaud Bernard, Wu Xi-Chen, Dyck Jason R.B., Hashimoto Kyoko, Wang Shaohua, Moudgil Rohit, Harry Gwyneth, et al. (2003). In Vivo Gene Transfer of the O₂-Sensitive Potassium Channel Kv1.5 Reduces Pulmonary Hypertension and Restores Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Chronically Hypoxic Rats. *Circulation* 107, 2037–2044.

Prewitt, A.R., Ghose, S., Frump, A.L., Datta, A., Austin, E.D., Kenworthy, A.K., and de Caestecker, M.P. (2015). Heterozygous null bone morphogenetic protein receptor type 2 mutations promote SRC kinase-dependent caveolar trafficking defects and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *J. Biol. Chem.* 290, 960–971.

Price, L.C., Wort, S.J., Perros, F., Dorfmüller, P., Huertas, A., Montani, D., Cohen-Kaminsky, S., and Humbert, M. (2012a). Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 141, 210–221.

Price, L.C., Wort, S.J., Perros, F., Dorfmüller, P., Huertas, A., Montani, D., Cohen-Kaminsky, S., and Humbert, M. (2012b). Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 141, 210–221.

Pullamsetti, S.S., Savai, R., Schaefer, M.B., Wilhelm, J., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Schudt, C., Fleming, I., Mayer, K., Leiper, J., et al. (2011). cAMP phosphodiesterase inhibitors increases nitric oxide production by modulating dimethylarginine dimethylaminohydrolases. *Circulation* 123, 1194–1204.

Pullamsetti, S.S., Seeger, W., and Savai, R. (2018). Classical IL-6 signaling: a promising therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 128, 1720–1723.

-R-

Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M., and Nicolls, M.R. (2014). Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 115, 165–175.

Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Péchoux, C., Bogaard, H.J., Dorfmüller, P., Remy, S., Lecerf, F., Planté, S., et al. (2015a). Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 131, 1006–1018.

- Ranchoux, B., Günther, S., Quarck, R., Chaumais, M.-C., Dorfmueller, P., Antigny, F., Dumas, S.J., Raymond, N., Lau, E., Savale, L., et al. (2015b). Chemotherapy-induced pulmonary hypertension: role of alkylating agents. *Am. J. Pathol.* *185*, 356–371.
- Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Böttinger, E.P., and Lisanti, M.P. (2001a). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J. Biol. Chem.* *276*, 6727–6738.
- Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G., et al. (2001b). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* *276*, 38121–38138.
- Redout, E.M., Wagner, M.J., Zuidwijk, M.J., Boer, C., Musters, R.J.P., van Hardeveld, C., Paulus, W.J., and Simonides, W.S. (2007). Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* *75*, 770–781.
- Ren, W., Watts, S.W., and Fanburg, B.L. (2011). Serotonin transporter interacts with the PDGF β receptor in PDGF-BB-induced signaling and mitogenesis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *300*, L486–497.
- Revuz, S., Decullier, E., Ginon, I., Lamblin, N., Hatron, P.-Y., Kaminsky, P., Carette, M.-F., Lacombe, P., Simon, A.-C., Rivièrè, S., et al. (2017). Pulmonary hypertension subtypes associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia: Haemodynamic profiles and survival probability. *PLoS ONE* *12*, e0184227.
- Rezvani, A.H., Overstreet, D.H., and Janowsky, D.S. (1990). Genetic serotonin deficiency and alcohol preference in the fawn hooded rats. *Alcohol Alcohol.* *25*, 573–575.
- Ricard Nicolas, Tu Ly, Le Hiress Morane, Huertas Alice, Phan Carole, Thuillet Raphaël, Sattler Caroline, Fadel Elie, Seferian Andrei, Montani David, et al. (2014). Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle–Like Cells in Pulmonary Hypertension. *Circulation* *129*, 1586–1597.
- Rodriguez-Hernandez, C.J., Sanchez-Perez, I., Gil-Mascarell, R., Rodríguez-Afonso, A., Torres, A., Perona, R., and Murguia, J.R. (2003). The immunosuppressant FK506 uncovers a positive regulatory cross-talk between the Hog1p and Gcn2p pathways. *J. Biol. Chem.* *278*, 33887–33895.
- Rosenzweig, E.B., Morse, J.H., Knowles, J.A., Chada, K.K., Khan, A.M., Roberts, K.E., McElroy, J.J., Juskiw, N.K., Mallory, N.C., Rich, S., et al. (2008). Clinical implications of determining BMPR2 mutation status in a large cohort of children and adults with pulmonary arterial hypertension. *J. Heart Lung Transplant.* *27*, 668–674.
- Rostama, B., Peterson, S.M., Vary, C.P.H., and Liaw, L. (2014). Notch signal integration in the vasculature during remodeling. *Vascul. Pharmacol.* *63*, 97–104.
- Rudarakanchana, N., Flanagan, J.A., Chen, H., Upton, P.D., Machado, R., Patel, D., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2002). Functional analysis of bone morphogenetic protein type II

receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1517–1525.

Ruffell, D., Mourkioti, F., Gambardella, A., Kirstetter, P., Lopez, R.G., Rosenthal, N., and Nerlov, C. (2009). A CREB-C/EBP β cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *PNAS* *106*, 17475–17480.

Russell-Puleri, S., Dela Paz, N.G., Adams, D., Chattopadhyay, M., Cancel, L., Ebong, E., Orr, A.W., Frangos, J.A., and Tarbell, J.M. (2017). Fluid shear stress induces upregulation of COX-2 and PGI₂ release in endothelial cells via a pathway involving PECAM-1, PI3K, FAK, and p38. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *312*, H485–H500.

Ryan, J.J., and Archer, S.L. (2014). The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ. Res.* *115*, 176–188.

Ryan, J., Bloch, K., and Archer, S.L. (2011). Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *International Journal of Clinical Practice*. Supplement 15–34.

Ryan, J.J., Marsboom, G., and Archer, S.L. (2013). Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol* *218*, 105–149.

-S-

Sakao, S., Taraseviciene-Stewart, L., Lee, J.D., Wood, K., Cool, C.D., and Voelkel, N.F. (2005). Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* *19*, 1178–1180.

Sakao, S., Tatsumi, K., and Voelkel, N.F. (2010). Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *43*, 629–634.

Salguero, K.L., and Cummings, J.J. (2002). Inhaled nitric oxide and methemoglobin in full-term infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pulm Pharmacol Ther* *15*, 1–5.

Salojin, K.V., Le Tonquèze, M., Nassovov, E.L., Blouch, M.T., Baranov, A.A., Saraux, A., Guillevin, L., Fiessinger, J.N., Piette, J.C., and Youinou, P. (1996). Anti-endothelial cell antibodies in patients with various forms of vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *14*, 163–169.

Sanchez, O., Sitbon, O., Jaïs, X., Simonneau, G., and Humbert, M. (2006). Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* *130*, 182–189.

Sanchez, O., Marcos, E., Perros, F., Fadel, E., Tu, L., Humbert, M., Darteville, P., Simonneau, G., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2007). Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *176*, 1041–1047.

Sands, M., Howell, K., Costello, C.M., and McLoughlin, P. (2011). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respir Res* 12, 1–13.

Sarkar, R., Meinberg, E.G., Stanley, J.C., Gordon, D., and Webb, R.C. (1996). Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 78, 225–230.

Savale, L., Tu, L., Rideau, D., Izziki, M., Maitre, B., Adnot, S., and Eddahibi, S. (2009). Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir. Res.* 10, 6.

Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., et al. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115, 2811–2821.

Schermuly, R.T., Pullamsetti, S.S., Kwapiszewska, G., Dumitrascu, R., Tian, X., Weissmann, N., Ghofrani, H.A., Kaulen, C., Dunkern, T., Schudt, C., et al. (2007). Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 115, 2331–2339.

Schopfer, F.J., Vitturi, D.A., Jorkasky, D.K., and Freeman, B.A. (2018). Nitro-fatty acids: New drug candidates for chronic inflammatory and fibrotic diseases. *Nitric Oxide* 79, 31–37.

Sebkhi, A., Strange, J.W., Phillips, S.C., Wharton, J., and Wilkins, M.R. (2003). Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 107, 3230–3235.

Seo, B., Oemar, B.S., Siebenmann, R., von Segesser, L., and Lüscher, T.F. (1994). Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 89, 1203–1208.

Shah, A.M., Campbell, P., Rocha, G.Q., Peacock, A., Barst, R.J., Quinn, D., Solomon, S.D., and IMPRES Investigators (2015a). Effect of imatinib as add-on therapy on echocardiographic measures of right ventricular function in patients with significant pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* 36, 623–632.

Shah, N.P., Wallis, N., Farber, H.W., Mauro, M.J., Wolf, R.A., Mattei, D., Guha, M., Rea, D., and Peacock, A. (2015b). Clinical features of pulmonary arterial hypertension in patients receiving dasatinib. *Am. J. Hematol.* 90, 1060–1064.

Shintani, M., Yagi, H., Nakayama, T., Saji, T., and Matsuoka, R. (2009). A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J. Med. Genet.* 46, 331–337.

Simonneau, G., Gatzoulis, M.A., Adatia, I., Celermajer, D., Denton, C., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Krishna Kumar, R., Landzberg, M., Machado, R.F., et al. (2013). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, D34–41.

Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams, P.G., and Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 53.

Sitbon, O., and Vonk Noordegraaf, A. (2017). Epoprostenol and pulmonary arterial hypertension: 20 years of clinical experience. *Eur Respir Rev* 26.

Sitbon, O., Humbert, M., Jagot, J.L., Taravella, O., Fartoukh, M., Parent, F., Herve, P., and Simonneau, G. (1998). Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 12, 265–270.

Sitbon, O., Humbert, M., and Simonneau, G. (2002a). Primary pulmonary hypertension: Current therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 45, 115–128.

Sitbon, O., Humbert, M., Nunes, H., Parent, F., Garcia, G., Hervé, P., Rainisio, M., and Simonneau, G. (2002b). Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: Prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 40, 780–788.

Sitbon, O., Jaïs, X., Le Pavec, J., Degano, B., Humbert, M., and Simonneau, G. (2008). [Pulmonary arterial hypertension associated with common diseases: connective-tissue diseases, HIV infection and portal hypertension]. *Rev Prat* 58, 2011–2018.

Soon, E., Holmes, A.M., Treacy, C.M., Doughty, N.J., Southgate, L., Machado, R.D., Trembath, R.C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., et al. (2010). Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122, 920–927.

Sousa-Squiavinato, A.C.M., Rocha, M.R., Barcellos-de-Souza, P., de Souza, W.F., and Morgado-Diaz, J.A. (2019). Cofilin-1 signaling mediates epithelial-mesenchymal transition by promoting actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion regulation in colorectal cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 418–429.

Southwood, M., Jeffery, T.K., Yang, X., Upton, P.D., Hall, S.M., Atkinson, C., Haworth, S.G., Stewart, S., Reynolds, P.N., Long, L., et al. (2008). Regulation of bone morphogenetic protein signalling in human pulmonary vascular development. *J. Pathol.* 214, 85–95.

Stacher, E., Graham, B.B., Hunt, J.M., Gandjeva, A., Groshong, S.D., McLaughlin, V.V., Jessup, M., Grizzle, W.E., Aldred, M.A., Cool, C.D., et al. (2012). Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 261–272.

Steiner, M.K., Syrkina, O.L., Kolliputi, N., Mark, E.J., Hales, C.A., and Waxman, A.B. (2009). Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 104, 236–244, 28p following 244.

Stenmark, K.R., Frid, M., and Perros, F. (2016). Endothelial-to-Mesenchymal Transition: An Evolving Paradigm and a Promising Therapeutic Target in PAH. *Circulation* 133, 1734–1737.

Steudel, W., Ichinose, F., Huang, P.L., Hurford, W.E., Jones, R.C., Bevan, J.A., Fishman, M.C., and Zapol, W.M. (1997). Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ. Res.* *81*, 34–41.

Stockwell, B.R., and Schreiber, S.L. (1998). TGF-beta-signaling with small molecule FKBP12 antagonists that bind myristoylated FKBP12-TGF-beta type I receptor fusion proteins. *Chem. Biol.* *5*, 385–395.

Sullivan, A., Chmura, K., Cool, C.D., Voelkel, N., and Chan, E.D. (2005). Pulmonary capillary hemangiomatosis: an immunohistochemical analysis of vascular remodeling in a fatal case. *Chest* *128*, 576S.

-T-

Tajsic, T., and Morrell, N.W. (2011). Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol* *1*, 295–317.

Tamura, Y., Phan, C., Tu, L., Le Hiress, M., Thuillet, R., Jutant, E.-M., Fadel, E., Savale, L., Huertas, A., Humbert, M., et al. (2018). Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* *128*, 1956–1970.

Tang, Q., Staub, C.M., Gao, G., Jin, Q., Wang, Z., Ding, W., Aurigemma, R.E., and Mulder, K.M. (2002). A novel transforming growth factor-beta receptor-interacting protein that is also a light chain of the motor protein dynein. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4484–4496.

Tang, X., Peng, R., Phillips, J.E., Deguzman, J., Ren, Y., Apparsundaram, S., Luo, Q., Bauer, C.M., Fuentes, M.E., DeMartino, J.A., et al. (2013). Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis. *Am. J. Pathol.* *183*, 470–479.

Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Alger, L., Hirth, P., Mc Mahon, G., Waltenberger, J., Voelkel, N.F., and Tuder, R.M. (2001). Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* *15*, 427–438.

Thenappan, T., Chan, S.Y., and Weir, E.K. (2018). Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *315*, H1322–H1331.

Thielen, N.G.M., van der Kraan, P.M., and van Caam, A.P.M. (2019). TGFβ/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. *Cells* *8*.

Thompson, A.A.R., and Lawrie, A. (2017). Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Mol Med* *23*, 31–45.

Thompson, K., and Rabinovitch, M. (1996). Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.* *166*, 495–505.

Thoré, P., Girerd, B., Jaïs, X., Savale, L., Ghigna, M.-R., Eyries, M., Levy, M., Ovaert, C., Servettaz, A., Guillaumot, A., et al. (2020). Phenotype and outcome of PAH patients carrying a TBX4 mutation. *Eur. Respir. J.*

Tian, X., Vroom, C., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Bieniek, E., Grimminger, F., Seeger, W., Schermuly, R.T., and Pullamsetti, S.S. (2011). Phosphodiesterase 10A upregulation contributes to pulmonary vascular remodeling. *PLoS ONE* 6, e18136.

Tian Wen, Jiang Xinguo, Sung Yon K., Shuffle Eric, Wu Ting-Hsuan, Kao Peter N., Tu Allen B., Dorfmueller Peter, Cao Aiqin, Wang Lingli, et al. (2019). Phenotypically Silent Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 Mutations Predispose Rats to Inflammation-Induced Pulmonary Arterial Hypertension by Enhancing the Risk for Neointimal Transformation. *Circulation* 140, 1409–1425.

Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C., and Quarck, R. (2019). TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov. Today* 24, 703–716.

Toba, M., Alzoubi, A., O'Neill, K.D., Gairhe, S., Matsumoto, Y., Oshima, K., Abe, K., Oka, M., and McMurtry, I.F. (2013). Temporal hemodynamic and histological progression in Sugen5416/hypoxia/normoxia-exposed pulmonary arterial hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 306, H243–H250.

Tonelli, A.R., Haserodt, S., Aytekin, M., and Dweik, R.A. (2013). Nitric oxide deficiency in pulmonary hypertension: Pathobiology and implications for therapy. *Pulm Circ* 3, 20–30.

Trembath, R.C., Thomson, J.R., Machado, R.D., Morgan, N.V., Atkinson, C., Winship, I., Simonneau, G., Galie, N., Loyd, J.E., Humbert, M., et al. (2001). Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 345, 325–334.

Troilo, H., Zuk, A.V., Tunnicliffe, R.B., Wohl, A.P., Berry, R., Collins, R.F., Jowitt, T.A., Sengle, G., and Baldock, C. (2014). Nanoscale structure of the BMP antagonist chordin supports cooperative BMP binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13063–13068.

Troilo, H., Barrett, A.L., Wohl, A.P., Jowitt, T.A., Collins, R.F., Bayley, C.P., Zuk, A.V., Sengle, G., and Baldock, C. (2015). The role of chordin fragments generated by partial tollid cleavage in regulating BMP activity. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 795–800.

Tsai, B.M., Turrentine, M.W., Sheridan, B.C., Wang, M., Fiore, A.C., Brown, J.W., and Meldrum, D.R. (2006). Differential effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery cytokine expression. *Ann. Thorac. Surg.* 81, 272–278.

Tuder, R.M. (2009). Pathology of pulmonary arterial hypertension. *Semin Respir Crit Care Med* 30, 376–385.

Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B., and Voelkel, N.F. (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* *144*, 275–285.

Tuder, R.M., Flook, B.E., and Voelkel, N.F. (1995). Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* *95*, 1798–1807.

Tuder, R.M., Cool, C.D., Geraci, M.W., Wang, J., Abman, S.H., Wright, L., Badesch, D., and Voelkel, N.F. (1999). Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *159*, 1925–1932.

Tuder, R.M., Chacon, M., Alger, L., Wang, J., Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Cool, C.D., Bishop, A.E., Geraci, M., Semenza, G.L., et al. (2001). Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* *195*, 367–374.

-U-

Ubil, E., Duan, J., Pillai, I.C.L., Rosa-Garrido, M., Wu, Y., Bargiacchi, F., Lu, Y., Stanbouly, S., Huang, J., Rojas, M., et al. (2014). Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature* *514*, 585–590.

Upton, P.D., Long, L., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2008). Functional characterization of bone morphogenetic protein binding sites and Smad1/5 activation in human vascular cells. *Mol. Pharmacol.* *73*, 539–552.

-V-

Vaillancourt, M., Ruffenach, G., Meloche, J., and Bonnet, S. (2015). Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Can J Cardiol* *31*, 407–415.

Vane, J.R., and Moncada, S. (1980). Prostacyclin. *Ciba Found. Symp.* *71*, 79–97.

Vaughan, M.H., and Hansen, B.S. (1973). Control of initiation of protein synthesis in human cells. Evidence for a role of uncharged transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* *248*, 7087–7096.

Vengethasamy, L., Hautefort, A., Tielemans, B., Belge, C., Perros, F., Verleden, S., Fadel, E., Van Raemdonck, D., Delcroix, M., and Quarck, R. (2016). BMPRII influences the response of pulmonary microvascular endothelial cells to inflammatory mediators. *Pflugers Arch.* *468*, 1969–1983.

Vergadi, E., Chang, M.S., Lee, C., Liang, O.D., Liu, X., Fernandez-Gonzalez, A., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2011). Early macrophage recruitment and alternative activation are critical for the later development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* *123*, 1986–1995.

Voelkel, N.F., and Gomez-Arroyo, J. (2014). The role of vascular endothelial growth factor in pulmonary arterial hypertension. The angiogenesis paradox. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *51*, 474–484.

Vonk-Noordegraaf, A., Haddad, F., Chin, K.M., Forfia, P.R., Kawut, S.M., Lumens, J., Naeije, R., Newman, J., Oudiz, R.J., Provencher, S., et al. (2013). Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* *62*, D22-33.

-W-

Wagner, J.G., Petry, T.W., and Roth, R.A. (1993). Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-linking in pulmonary artery endothelium. *The American Journal of Physiology* *264*, L517-522.

Wang, G., Fan, R., Ji, R., Zou, W., Penny, D.J., Varghese, N.P., and Fan, Y. (2016). Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med* *16*, 17.

Westermarck, B., Claesson-Welsh, L., and Heldin, C.-H. (1989). Structural and functional aspects of the receptors for platelet-derived growth factor. *Progress in Growth Factor Research* *1*, 253–266.

Wharton, J., Strange, J.W., Møller, G.M.O., Growcott, E.J., Ren, X., Franklyn, A.P., Phillips, S.C., and Wilkins, M.R. (2005). Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *172*, 105–113.

White, K., Johansen, A.K., Nilsen, M., Ciucan, L., Wallace, E., Paton, L., Campbell, A., Morecroft, I., Loughlin, L., McClure, J.D., et al. (2012). Activity of the estrogen-metabolizing enzyme cytochrome P450 1B1 influences the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* *126*, 1087–1098.

White, R.J., Meoli, D.F., Swarthout, R.F., Kallop, D.Y., Galaria, I.I., Harvey, J.L., Miller, C.M., Blaxall, B.C., Hall, C.M., Pierce, R.A., et al. (2007). Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *293*, L583-590.

Wilkins, M.R., Aman, J., Harbaum, L., Ulrich, A., Wharton, J., and Rhodes, C.J. (2018). Recent advances in pulmonary arterial hypertension. *F1000Res* *7*, 1128.

Wilson, D.W., Segall, H.J., Pan, L.C., and Dunston, S.K. (1989). Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvascular Research* *38*, 57–80.

Wilson, G.J., Bunpo, P., Cundiff, J.K., Wek, R.C., and Anthony, T.G. (2013). The eukaryotic initiation factor 2 kinase GCN2 protects against hepatotoxicity during asparaginase treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *305*, E1124-1133.

-X-

Xi, X., Zhang, J., Wang, J., Chen, Y., Zhang, W., Zhang, X., Du, J., and Zhu, G. (2019). SGK1 Mediates Hypoxic Pulmonary Hypertension through Promoting Macrophage Infiltration and Activation (Hindawi).

Xie, T., Liang, J., Liu, N., Huan, C., Zhang, Y., Liu, W., Kumar, M., Xiao, R., D'Armiento, J., Metzger, D., et al. (2016). Transcription factor TBX4 regulates myofibroblast accumulation and lung fibrosis. *J. Clin. Invest.* *126*, 3063–3079.

Xiong, P.Y., Potus, F., Chan, W., and Archer, S.L. (2018). Models and Molecular Mechanisms of World Health Organization Group 2 to 4 Pulmonary Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* *71*, 34–55.

-Y-

Yamamoto, A., Takahashi, H., Kojima, Y., Tsuda, Y., Morio, Y., Muramatsu, M., and Fukuchi, Y. (2008). Downregulation of Angiotensin-1 and Tie2 in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *RES* *75*, 328–338.

Yang, X., Long, L., Southwood, M., Rudarakanchana, N., Upton, P.D., Jeffery, T.K., Atkinson, C., Chen, H., Trembath, R.C., and Morrell, N.W. (2005). Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* *96*, 1053–1063.

Yao, D., Doré, J.J., and Leaf, E.B. (2000). FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization. *J. Biol. Chem.* *275*, 13149–13154.

Yi, E.S., Kim, H., Ahn, H., Strother, J., Morris, T., Masliah, E., Hansen, L.A., Park, K., and Friedman, P.J. (2000). Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *162*, 1577–1586.

Yoon, M.-S., Sun, Y., Arauz, E., Jiang, Y., and Chen, J. (2011). Phosphatidic Acid Activates Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Kinase by Displacing FK506 Binding Protein 38 (FKBP38) and Exerting an Allosteric Effect. *J. Biol. Chem.* *286*, 29568–29574.

Yung Lai-Ming, Yang Peiran, Bocobo Geoffrey, Dinter Teresa, McNeil Megan, Chen Po-Sheng, Southwood Mark, Morrell Nicholas, Pearsall Scott, Joshi Sachindra, et al. (2018). Abstract 17217: ActRIIA-Fc Rebalances Activin/GDF and BMP9 Signaling to Attenuate Experimental Pulmonary Hypertension. *Circulation* *138*, A17217–A17217.

-Z-

Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., and Bogoyevitch, M.A. (2016). JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *80*, 793–835.

Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D.D., Yi, E.S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P.A., Kriett, J.M., Yung, G., Rubin, L.J., and Yuan, J.X.-J. (2003). Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *285*, L740-754.

Zhao, Y.-Y., Zhao, Y.D., Mirza, M.K., Huang, J.H., Potula, H.-H.S.K., Vogel, S.M., Brovkovich, V., Yuan, J.X.-J., Wharton, J., and Malik, A.B. (2009). Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *J. Clin. Invest.* *119*, 2009–2018.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., and Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* *6*, 931–940.

Titre : Etude de la physiopathologie des formes héritables d'hypertension artérielle pulmonaire

Mots clés : Hypertension Pulmonaire, Maladie veino-occlusive pulmonaire, General control nonderepressible 2, Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4, Bone morphogenetic protein receptor 2, Bone morphogenetic protein

Résumé : L'Hypertension Artérielle Pulmonaire (HTAP), qu'elle soit purement précapillaire ou avec une composante veineuse (MVOP) résulte de l'obstruction progressive des vaisseaux pulmonaires de petits calibres dû à un remodelage obstructif de leur paroi. Cette thèse s'intéresse aux formes héritables, liées à des mutations sur des gènes de prédisposition à l'HTAP ou à la MVOP (BMPR2 ou EIF2AK4 respectivement). Nous avons ainsi découvert un lien fonctionnel entre l'axe BMPRII et l'axe dépendant de GCN2 (la protéine codée par EIF2AK4) dans la MVOP humaine et expérimentale induite chez le rat par l'exposition à la mitomycine. Notre deuxième étude a montré qu'un épissage alternatif (modification post-transcriptionnelle de l'ARNm) de BMPR2 favorisant la forme courte de BMPR-II pourrait favoriser l'occurrence de l'HTAP dans le contexte d'une voie BMPR-II déjà affaiblie par la mutation d'un des allèles de ce gène de prédisposition.

Title : Study of Pathophysiology of heritable forms of pulmonary arterial hypertension

Keywords : Pulmonary arterial hypertension, Pulmonary veno-occlusive disease, General control nonderepressible 2, Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4, Bone morphogenetic protein receptor 2, Bone morphogenetic protein

Abstract: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH), whether purely precapillary or with a venous component (PVOD), results from the progressive obstruction of small-caliber pulmonary vessels due to obstructive remodeling of their wall. This thesis is focused on heritable forms, linked to mutations in genes predisposing to PAH or PVOD (BMPR2 or EIF2AK4 respectively). We have thus discovered a functional link between the BMPRII axis and the GCN2 (the protein encoded by EIF2AK4) dependent axis in human and experimental PVOD induced in rats by mitomycine exposure. Our second study showed that an alternative splicing (post-transcriptional modification of mRNA) of BMPR2 promoting the short form of BMPR-II could promote the occurrence of PAH in the context of a BMPR-II pathway already weakened by the mutation of one of the alleles of this predisposition gene.