



**HAL**  
open science

# Conséquences du déficit en GCN2 chez le murin et l'Homme : implications en physiopathologie de la maladie veino-occlusive pulmonaire

Juliette Bignard

## ► To cite this version:

Juliette Bignard. Conséquences du déficit en GCN2 chez le murin et l'Homme : implications en physiopathologie de la maladie veino-occlusive pulmonaire. Pneumologie et système respiratoire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS381 . tel-03666697

**HAL Id: tel-03666697**

**<https://theses.hal.science/tel-03666697>**

Submitted on 12 May 2022

**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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE SORBONNE  
UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE DE PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

*Unité UMRS1166 : Unité de recherche sur les maladies cardiovasculaires et métaboliques*

---

# Conséquences du déficit en GCN2 chez le murin et l'Homme : implications en physiopathologie de la maladie veino-occlusive pulmonaire

---

Par Juliette Bignard

Dirigée par Pf Florent Soubrier et Dr Sophie Nadaud

Présentée et soutenue publiquement le 03 décembre 2021

Devant un jury composé de :

Professeur Alexandra DURR

Professeur Pierre-Louis THARAUX

Docteur Pierre FAFOURNOUX

Professeur David MONTANI

Professeur Serge ADNOT

Docteur Frédéric PERROS

Professeur Florent SOUBRIER

Docteur Sophie NADAUD

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse



*A mes parents,*



# Remerciements

---

Je veux tout d'abord remercier le Professeur Soubrier pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir guidé et aidé toute au long de ces 3 années de thèse. Le sérieux et le professionnalisme ont toujours été les mots d'ordre de notre relation et pourtant cela ne nous a pas empêché de développer une certaine complicité. J'ai rencontré de multiples obstacles durant ces 3 années, heureusement que vous étiez là pour les affronter avec moi. Pour tout ce que vous m'avez appris, sur le monde de la génétique, de la médecine, de la biologie et surtout sur moi, je vous suis infiniment reconnaissante.

Je remercie le Professeur Alexandra Durr pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de la soutenance de thèse.

Je remercie également le Professeur Pierre-Louis Tharaux et le Docteur Pierre Fafournoux d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Merci au Professeur David Montani et au Professeur Serge Adnot pour avoir accepté d'être examinateurs de mon mémoire de thèse.

Un merci tout particulier au Docteur Frédéric Perros pour son implication dans mon projet et d'avoir accepté d'être examinateur de mon mémoire. Tu m'as souvent félicité pour ma motivation mais je pense qu'elle n'égale jamais la tienne. Je te remercie pour toutes nos discussions, pour tes réponses à mes multiples questions, pour ton soutien et pour tout le temps que tu as accordé à mon projet. Toutes tes idées ne cessent d'en inspirer de nouvelles. Je ne pense pas me tromper en affirmant que GCN2 est entre de très bonnes mains.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Sophie Nadaud pour son soutien et pour toutes les réponses à mes questions. C'était agréable de savoir que je pouvais venir n'importe quand dans ton bureau pour discuter de mes différents résultats.

Je remercie particulièrement Fabrice Atassi, qui est celui qui a vu évoluer le projet du début jusqu'à la fin. Tu sais donc à quel point certaines périodes ont été difficiles pour moi. Moi, petite chimiste ne sachant rien faire des manip' de biologie, je te remercie chaleureusement

pour toute l'aide que tu m'as apporté et ton implication dans ce projet. Je savais que je pouvais compter sur toi dans les coups durs. GCN2 n'aura pas eu raison de nous !

Merci à mon fraté Julien. Je crois bien que je n'aurais pas réussi cette thèse sans toi. Il y avait des matins plus sombres que d'autre et, crois-le ou non, c'était souvent toi le rayon de soleil du labo (si si je t'assure). On a tenu notre devise : on commence ensemble, on finit ensemble. A la guerre comme à la guerre (là je sais que je titille l'ancien militaire qui est en toi), on finira ces thèses en beauté. PW1 et GCN2, on en aura fait qu'une bouchée. Heureusement que tu étais là. Pilier de thèse, je ne te remercierai jamais assez. Aller j'arrête de m'étaler, je sais que tu n'aimes pas ça. Love love cœur BG des îles.

Merci à ma copine, le Docteur Mathilde Flamand. J'ai traversé ma première année de thèse un peu dans le brouillard. Admire la métaphore (ou pas), mais c'était toi qui tenais la lanterne devant pour m'aider à avancer. J'espère réussir aussi bien que toi.

Merci aussi à ma cop-copine Elo. Nos conversations nocturnes vont me manquer à coup de « Bon aller, faut vraiment que j'y aille. Ah mais non je te n'ai pas dit ça aussi ! ». Merci d'avoir été un petit soleil portugais au milieu de la grisaille parisienne.

Merci à Olivier. Les odeurs de nouilles dans le bureau me manquaient presque après ton départ. S'occuper des rats en plus ce n'est vraiment pas drôle ! Je te souhaite le meilleur pour la suite !

Merci à mes collègues adorés : le trio Marie-Brice-Pierre. Je sais que je pouvais venir dans vos bureaux pour me plaindre, pour pleurer sur mes manip' qui ne marchent pas ou tout simplement pour me changer les idées. Merci à QueenB pour ces histoires rocambolesques des 8h du matin. Nos conversations matinales vont me manquer. Merci Marie pour sa patience et surtout son oreille attentive. S'il y a bien quelqu'un qui mérite de réussir, c'est toi. Enfin merci à Pierre pour sa gentillesse et son humour. Pour moi, tu resteras à jamais, l'homme qui fait battre les cœurs.

Merci à l'autre partie de l'équipe 3. Elise, Gilles, Camille, Chloé et Basile. Loin dans le couloir, près du cœur. Gilles, passion manga à la vie, à la mort. Ce n'est pas parce que je pars que tu ne peux plus me mettre au courant des derniers épisodes One Piece. Merci Elise pour ton aide et tes précieux conseils pendant les réunions d'équipe. Cam-CASK et Doudou je vous souhaite que des bonnes choses, merci pour la bonne ambiance et tenez bon.

Un grand merci à ma collègue, le Docteur Sophie Besse. Tu étais toujours présente pour répondre à mes questions et m'aider quand j'en avais besoin.

Merci à ma collègue le Docteur Nathalie Mougenot pour son aide précieuse lors des matins « rats » comme on les appelait. Ce n'était pas des moments très agréables et pourtant je n'en garde que des bons souvenirs !

Merci à ma collègue le Docteur Catherine Pavoine pour avoir répondu à mes nombreuses questions en immunologie et d'avoir accepté de corriger une partie de ma thèse. L'immuno ce n'est vraiment pas drôle, merci infiniment pour ton aide.

Merci aussi à tous les membres de l'équipe 1 pour avoir accepté de répondre à mes questions (parfois un peu naïves) sur la génétique. Océane, courage pour le reste de ta thèse !

Un merci tout particulier au docteur Vincent Fontaine pour m'avoir formé sur les cellules iPS. Ta passion pour la biologie cellulaire est contagieuse. Merci de m'avoir aidé à trouver ma voie et j'espère acquérir la même expertise que toi dans ma carrière.

Mon tit frère, nos soirées hebdomadaires à Pasta e Fagioli resteront mes meilleurs souvenirs. Si tu savais comme ces soirées m'aidaient à passer une meilleure journée. « La manip' n'a pas marché... Heureusement ce soir c'est pizza avec mon frère. » Merci d'être toujours présente. Merci pour ton écoute. Merci pour ton soutien. Depuis l'internat jusqu'à nos aventures parisiennes. Surtout que ce n'est que le début, le monde n'a pas fini d'entendre parler de nous.

Merci à Lucie et Maëlle pour leur soutien permanent. Nos week-end escapades aux quatre coins de la France me faisaient toujours un bien fou. Mama, je ne pourrais pas décrire une amie aussi fidèle et attentionnée que toi. Ça fait bien longtemps que tu m'as tendue la main à l'internat, sache que je ne la lâcherai jamais. Ma lulu, tu es cette amie qui arrivera toujours à me faire rire et à me consoler. C'était il n'y a pas si longtemps que je suis venue te voir, ma couette dans les mains : « Oh on a la même housse de couette. » Qui aurait cru qu'une simple phrase aboutisse à une si belle amitié.

Merci à mes frères de cœur. Vava et Chaha. Loin des frères, triste Big.J. Et pourtant les frontières Ecossaises ou Suisses ne vous empêcheront jamais d'être les meilleurs frères pour moi. Vava, tu le sais mais je te l'écris noir sur blanc : t'es vraiment ma super meilleure copine.

Nos fous rires me manquent. Heureusement, il me suffit d'un vocal pour te retrouver. J'ai traversé cette thèse avec difficulté, je sais que toi aussi. Je finis avant toi et pourtant je sais déjà que tu finiras la tienne en beauté. Petit génie va. Ma chacha, je n'ai pas les mots pour décrire notre relation. Les années 128 rue Paul Bert resteront mes plus belles années. Tu étais la meilleure des coloc'. La encore, il me suffit de te revoir quelques secondes pour retrouver mon petit porc préféré. Toi aussi ça sera la thèse finger in the nose. Tu le mérites amplement. Sache que je serais toujours là pour toi.

Merci à mes copines de Lyon : Megoux, Fannou et Babs. Nos petits week-end filles me changeaient toujours les idées, que ce soit à Lyon, Grenoble, Paris ou en Ardèche. Vous êtes toutes des filles en or, et je suis fière de compter parmi vos amies.

Merci à mes copines de Rouen : Jeannou, Roro, Man', Anne et Marly. Il y a de ces amitiés qui dureront toujours. Peu importe ce qui se passe, je sais que vous serez toujours là. Pour ça, je ne vous remercierais jamais assez. Vous me connaissez par cœur, vous savez donc à quel point vous comptez pour moi.

Enfin je voudrais remercier ma famille :

Je remercie ma petite sœur, Clotilde, pilier indestructible de ma vie. Tu es plus jeune et pourtant tu es bien plus sage que moi. Tu m'as énormément aidé à traverser cette thèse. Les soirées Picard/Charmed étaient un des meilleurs remèdes aux mauvaises journées passées au labo. Je ne me lasserai jamais de ces soirées sœurs, je ne me lasserai jamais de toi. Merci d'être-là, je t'aime fort.

Je remercie ma cousine, Elodie, une main toujours tendue. Je serais toujours là pour toi et tu serais toujours là pour moi. Ton soutien infailible m'a permis de traverser les abysses de la thèse presque sans encombre. Nos soirées sushis à parler des heures d'absolument tout et n'importe quoi me permettaient toujours de me vider la tête. Toi et moi c'est pour la vie. Depuis toujours et pour toujours, merci d'être toi, merci d'être là.

Merci à mes deux grands frères. Peu importe quand, peu importe comment, je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

Merci à ma grande famille, à mes tantes adorées pour nos soirées tantes-cousines. Merci à tous mes cousins pour les soirées cousinades qui resteront gravées dans ma mémoire. Merci

à tonton et Sophie de m'avoir accueilli de nombreuses fois dans le sud, un grand merci à mon filleul Romain, qui gardera toujours une place toute particulière dans mon cœur.

Enfin merci à mes parents, à qui je dédie cette thèse. Merci de m'avoir guidé, aidé, relevé... Sans vous, rien n'aurait été possible. Il n'y a pas assez de mots pour décrire votre soutien : une pomme glissée dans le sac, un magazine déposé sur le lit, un chèvre frais laissé dans le frigo, une tarte au citron cuisinée en dessert, un câlin envoyé par la pensée... Merci pour tout.

Je vais finir par celui qui aura tout traverser avec moi. Cette thèse, c'est aussi un peu la tienne. La pudeur m'empêche d'écrire ma reconnaissance. Je ne pense pas avoir besoin, ça fait maintenant 6 ans que tu le sais. Merci à toi mon amour de partager ma vie.



# Résumé

---

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une forme rare d'hypertension pulmonaire caractérisée par un remodelage vasculaire à prédominance veineuse. La forme héréditaire de la maladie (MVOPh) est liée à des mutations bialléliques du gène *EIF2AK4*. Ces mutations conduisent à la perte de fonction de la protéine GCN2. A ce jour, les mécanismes physiopathologiques de la MVOPh liés à la perte de fonction de GCN2 sont à élucider. L'objectif de cette thèse est d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place chez le rat *Gcn2<sup>-/-</sup>* déclenchés par un stress métabolique et chez le patient atteint de MVOPh. Ce travail établit le rôle essentiel de la protéine GCN2 dans le maintien de l'homéostasie et la protection contre l'inflammation pulmonaire lors d'une carence en glutamine et asparagine chez le rat. Une étude cellulaire a permis de mettre en évidence la présence d'une population de lymphocyte T caractérisée par une expression accrue de LAG3 unique aux rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* en condition basale. Plus précisément, nous identifions un tout nouveau rôle de *Gcn2* dans la régulation du système immunitaire adaptatif indépendamment d'une carence en acide aminé. En parallèle, nous avons exploré les similitudes et les différences des transcriptomes de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (HTAPi) et ceux souffrant de MVOPh. Nous montrons que la baisse de l'inflammation est un processus discriminant la MVOPh de l'HTAPi et que la dysfonction endothéliale semble partagée par les deux maladies. En résumé, ce travail renforce le statut protecteur de GCN2 contre l'inflammation lors d'une carence en acide aminé et révèle un nouveau rôle dans la régulation du système immunitaire adaptatif en condition basale. Les différences entre la MVOP et l'HTAP ouvrent de nouvelles perspectives pour trouver des biomarqueurs permettant de différencier les deux maladies tandis que les similitudes aident à mieux comprendre les mécanismes du développement de la MVOPh.



# Sommaire

---

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>10</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>12</b>
<b>ABBREVIATIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....</b>	<b>18</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>22</b>
<b>1. LA PROTEINE GCN2.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Généralités sur la protéine GCN2 : Structure, fonction et substrat de GCN2 .....</b>	<b>24</b>
a) Structure de GCN2.....	24
b) Fonction et substrat de GCN2 .....	26
<b>1.2. Les mécanismes d'activation et de régulation de GCN2.....</b>	<b>27</b>
a) Le mécanisme d'activation de GCN2 .....	27
b) Régulateur de GCN2 : les ARN de transfert désacétylés .....	28
c) Régulateur de GCN2 : les ribosomes et les protéines P .....	29
<b>1.3. La réponse de GCN2 à un stress métabolique.....</b>	<b>32</b>
a) GCN2, un détecteur du manque en acides aminés .....	32
b) L'ISR .....	34
c) Amino Acid Response (AAR) .....	40
d) Apoptose .....	41
e) Autophagie .....	44
f) mTOR : l'inhibiteur de GCN2 .....	47
<b>1.4. La réponse de GCN2 à un stress inflammatoire .....</b>	<b>52</b>
a) Le système immunitaire .....	52

b)	La réponse inflammatoire .....	55
c)	GCN2, un régulateur de la réponse inflammatoire .....	59
<b>2.</b>	<b>LA MALADIE VEINO-OCCLUSIVE PULMONAIRE (MVOP).....</b>	<b>64</b>
<b>2.1.</b>	<b>Définition générale de la MVOP .....</b>	<b>64</b>
a)	Définition .....	64
b)	Classification .....	65
c)	Epidémiologie .....	67
d)	Diagnostic .....	67
e)	Traitement .....	70
<b>2.2.</b>	<b>Forme sporadique de la MVOP .....</b>	<b>71</b>
a)	Facteurs déclenchants .....	71
b)	Modèles animaux .....	72
<b>2.3.</b>	<b>Forme héréditaire de la MVOP .....</b>	<b>73</b>
a)	Mutation <i>EIF2AK4</i> .....	73
b)	Modèles animaux .....	74
<b>2.4.</b>	<b>Physiopathologie de la MVOP .....</b>	<b>76</b>
a)	Anatomopathologie de la MVOP .....	76
b)	Pathogénèse de la MVOP .....	79
<b>3.</b>	<b>L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE (HTAP) .....</b>	<b>82</b>
<b>3.1.</b>	<b>Définition générale de l'HTAP .....</b>	<b>82</b>
a)	Définition .....	82
b)	Classification .....	83
c)	Epidémiologie .....	83
d)	Diagnostic .....	84
e)	Traitement .....	86
<b>3.2.</b>	<b>Génétique de l'HTAP .....</b>	<b>92</b>
a)	Mutation <i>BMPR2</i> .....	92
b)	Les autres gènes de la voie BMP .....	95
c)	Les autres gènes en dehors de la voie BMP .....	96
<b>3.3.</b>	<b>Physiopathologie de l'HTAP .....</b>	<b>99</b>
a)	Anatomopathologie de l'HTAP .....	99

b) Pathogénèse de l'HTAP.....	100
<b>HYPOTHESE DE L'ETUDE .....</b>	<b>106</b>
<b>EXPOSE DES TRAVAUX .....</b>	<b>110</b>
<b>Projet n°1 : Analyse des mécanismes liés à la perte de fonction de GCN2 en réponse à un stress métabolique chez le rat. Liens avec la MVOP .....</b>	<b>112</b>
Introduction .....	112
Méthodes.....	114
Résultats .....	117
Article.....	120
<b>Projet n°2 : Similitudes et différences entre la maladie veino occlusive pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire.....</b>	<b>121</b>
Introduction .....	121
Méthodes.....	122
Résultats .....	124
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
Discussion sur les résultats observés chez le rat <i>Gcn2<sup>-/-</sup></i> .....	136
Discussion sur les résultats observés chez l'humain .....	143
Discussion sur l'ensemble des résultats.....	149
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>151</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>159</b>



# Abbréviations

AAR :	Amino Acid Response	GCN20 :	General control non-derepressible 20
ACP :	Analyse en composantes principales	GEF :	Guanine nucleotide exchange factors
ActRIIA :	Activine de type IIA	GNLY :	Granulysine
ANG1 :	Angiopoiétine I	GSEA :	Gene set enrichment analysis
ARNt :	ARN de transfert	GV :	Gcn2 <sup>-/-</sup> Vhcl
ARNt <sup>désat</sup> :	ARN de transfert désacétylés	HCP :	Hémangiomatose capillaire pulmonaire
ARN <sub>ti</sub> <sup>Met</sup> :	ARN de transfert-méthionyle	HisRS :	Histidyl-tRNA Synthetase-like
ASNS :	Asparaginase synthétase	HMGB1 :	High mobility group protein B1
ATF4 :	Activating Transcription Factor 4	HP :	Hypertension pulmonaire
ATF5 :	Activating Transcription Factor 5	HRI :	Heme-Regulated eIF2 $\alpha$ kinase
BCR :	B cell receptor	HSP90 :	Heat shock 90
BMPs :	Bone Morphogenic Proteins	HTAP :	Hypertension artérielle pulmonaire
CARE :	CCAAT-enhancer binding protein-activating transcription factor (C/EBP-ATF) response elements	ICAM :	Inter-Cellular Adhesion Molecules
CAT-1 :	(cationic amino acid transporter-1)	IDO1 :	Indoleamine-2,3-dioxygenase 1
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité	IL :	Interleukine
CML :	Cellules musculaires lisses	ISR :	Integrated stress response
CPA :	Cellules présentatrices d'antigène	LPS :	Lipopolysaccharides
CRT :	Calreticulin	LTh :	Lymphocytes T helpers
CTD :	C-terminal domain	MEC :	Matrice extracellulaire
CTL :	CD8 <sup>+</sup> T cytotoxique	mLST8 :	Mammalian lethal with SEC13 protein 8
CTTs :	C-terminal tails	MMC :	Mitomycine-C
DAMPs :	Damage Associated Molecular Pattern	MMP9 :	Métalloprotéinases matricielles 9
DEGs :	Differentially expressed genes	MPO :	Myéloperoxydase
DEPTOR :	DEP domain-containing mTOR-interacting protein	MRS :	Methionyl-ARNt synthetase
DLCO :	Diffusion du monoxyde de carbone	MSigDB :	Molecular Signatures Data Base
DSS :	dextran sodium sulfate	mSin1 :	Mammalian stress-activated protein kinase(SAPK)-interacting protein 1
eEF3 :	Facteur d'élongation eucaryote	mTOR :	Mechanistic target of rapamycin
EIF2AK4 :	Eukaryotic translation initiation factor 4	MVOP :	Maladie veino-occlusive pulmonaire
EN :	Elastase neutrophile	NET :	Neutrophil Extracellular Traps
endoMT :	Transition endothéliale mésenchymateuse	NIR :	Numéro d'intégrité de l'ARN
ET-1 :	Endothéline 1	NK :	Cellules natural killer
GA :	Gcn2 <sup>-/-</sup> ASNase	NKT :	Natural killer T lymphocyte
GADD34 :	Growth arrest and DNA damage	NLRs :	NOD-like Receptors
GCN1 :	General control non-derepressible 1		
GCN2 :	General control non-derepressible 2		

PAMPs :	Pathogen-Associated Molecular Patterns	RMN :	Résonance magnétique nucléaire
PAPm :	Pression artérielle pulmonaire moyenne	ROS :	Reactive oxygen species
PAPO :	Pression artérielle pulmonaire d'occlusion	RVP :	Résistance vasculaire pulmonaire
PCP :	Pression capillaire pulmonaire	RWD :	RING finger WD Repeat
		SNAT2	System A Neutral Amino acid Transporter 2
PDE5 :	Phosphodiesterase 5	SU5416 :	Sugen
PERK :	PKR like endoplasmic reticulum kinase	TCR :	T cell receptor
PGI <sub>2</sub> :	Prostacycline	TDM :	Tomodensitométrie thoracique à haute résolution
PK :	Domaine de la kinase	Teff :	Lymphocytes T effectrice
PKR :	Double-stranded RNA-activated protein kinase	TLR :	Toll-like receptor
PP1 :	Protéine phosphatase 1	Treg :	Lymphocyte T régulatrice
PRAS40 :	40 kDa proline-rich Akt substrate	uORFs :	Upstream open reading frame
PRRs :	Pattern-Recognition Receptors	wvF :	Von Willebrand
RAPTOR :	Regulatory-associated protein of mTOR	WA :	WT ASNase
RBPs :	Ribonucléoprotéines	WT :	Wild-type
Rheb :	Ras homolog enriched in brain	WV :	WT Vhcl
Rictor :	Rapamycin-insensitive companion of mTOR	ψPK :	Domaine de la pseudokinase

# Liste des figures et des tableaux

---

Figure 1 : Domaines de la protéine sérine thréonine kinase GCN2 chez les mammifères.....	24
Figure 2 : Les structures des différents domaines de la protéine GCN2 .....	25
Figure 3 : Modèle d'activation de GCN2 sous stress cellulaire .....	27
Figure 4 : Comparaison entre le mécanisme d'activation de GCN2 par l'accumulation des ARNt <sup>désat</sup> avec le mécanisme d'élongation des ARNt acétylés dans la levure .....	29
Figure 5 : Schémas de l'activation de GCN2 par le complexe "P-stalk" sous stress métabolique .....	31
Figure 6 : Mécanismes de l'ISR (l'Integrated Stress Response).....	35
Figure 7 : Schéma de l'étape d'initiation de la traduction des protéines .....	36
Figure 8 : Schéma de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.....	37
Figure 9 : Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés.....	39
Figure 10 : Exemple de gènes possédant la séquence CARE (C/EBP-ATF response elements). .....	40
Figure 11 : Résumé des composants majoritaires de la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	42
Figure 12 : Mécanisme général de la macro-autophagie. ....	45
Figure 13 : Schéma mécanistique de la régulation des gènes de l'autophagie par la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ /ATF4 .....	46
Figure 14 : Structure schématique des complexes mTORC1 et mTORC2 .....	47
Figure 15 : Mécanismes de la voie mTORC1 régulée par les acides aminés.....	48
Figure 16 : Schéma du mécanisme d'inhibition de la voie mTORC1 lors d'une carence en acides aminés menant à l'activation de GCN2 dans la levure .....	49
Figure 17 : Schéma du mécanisme d'inhibition de mTORC1 par activation de GCN2 lors d'une carence en acides aminés .....	50

Figure 18 : Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire.....	54
Figure 19 : Les causes et conséquences physiologiques et pathologiques de l'inflammation	56
Figure 20 : Processus de recrutement des cellules circulantes lors d'une inflammation.....	58
Figure 21 : Contrôle métabolique des lymphocytes T via l'activation d'IDO1 chez les CPA....	61
Figure 22 : Mécanisme protecteur de GCN2 lors d'une inflammation intestinale.....	63
Figure 23 : Mesure de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) dans la MVOP.	68
Figure 24 : Image de tomодensitométrie thoracique à haute résolution caractéristique de la MVOP.....	69
Figure 25 : Schéma d'une famille porteuse de la maladie veino-occlusive pulmonaire héréditaire (MVOPh).....	73
Figure 26 : Localisation des mutations du gène <i>EIF2AK4</i> détectées chez les patients atteints de la MVOP.....	74
Figure 27 : Lésions histologiques de la maladie veino-occlusive pulmonaire .....	76
Figure 28 : Lésions vasculaires de la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP).....	78
Figure 29 : Mécanisme conduisant à une transition endothélial mésenchymateuse chez le rat traité à la mitomycine .....	80
Figure 30 : Mécanisme justifiant l'augmentation de production de collagène dans les cellules musculaires lisses des patients porteurs de la mutation <i>EIF2AK4</i> atteints de MVOP héréditaire .....	81
Figure 31 : Schéma d'une mesure de pression pulmonaire par cathétérisme droit pour le diagnostic de l'HTAP.....	85
Figure 32 : Cibles des traitements actuels de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	87
Figure 33 : Proposition du mécanisme d'action du sotatercept dans l'HTAP.....	90
Figure 34 : Les mutations <i>BMPR2</i> associées à l'HTAP.....	92
Figure 35 : Schéma de la voie de signalisation de <i>BMPR2</i> .....	94

Figure 36 : Gène de prédisposition de l'HTAP familiale .....	98
Figure 37 : Caractéristiques histologique de l'HTAP .....	100
Figure 38 : Mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP. ....	101
Figure 39 : Cellules inflammatoires impliquées dans l'HTAP .....	105
Figure 40 : Le nombre de gène différentiellement exprimés en fonction du type d'analyse différentielle réalisée entre les groupes expérimentaux.....	124
Figure 41 : Diagramme de Venn comparant les analyses différentielles des MVOPh et des HTAPi contre les contrôles .....	125
Figure 42 : Expressions des gènes MMP9 et SOCS2 mesurées par RT-qPCR.....	126
Figure 43 : Niveau protéique des protéines MMP9 et E-selectine dans les groupes expérimentaux .....	126
Figure 44 : Niveau protéique des protéines ATF4 et CHOP dans les groupes expérimentaux .....	127
Figure 45 : Comparaison des analyses GSEA entre les MVOP vs Ctrl et HTAP vs Ctrl .....	128
Figure 46 : Analyse en composantes principales sur tous les échantillons humains .....	129
Figure 47 : Résultats de l'analyse différentielle fusionnant les échantillons HTAP et MVOP	130
Figure 48 : Niveau protéique des protéines CXCR4 et TIE2 dans les groupes expérimentaux .....	131
Figure 49 : Dotplot indiquant le ratio entre le nombre de gènes surreprésentés dans notre liste de gènes et les gènes de la voie de signalisation.....	132
Figure 50 : Evolution de la population T_LAG3 chez les rats <i>Gcn2<sup>-/-</sup></i> dans les différentes conditions expérimentales.....	138
Figure 51 : Schéma récapitulatif des différentes voies impliquées dans l'augmentation de l'inflammation pulmonaire chez les rats <i>Gcn2<sup>-/-</sup></i> traité à l'asparaginase .....	141
Tableau 1 : Extrait de la classification de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	66
Tableau 2 : Liste des signes évocateurs de la MVOP .....	66

Tableau 3 : Dépistage recommandé en fonction du contexte..... 86

# Introduction

---



# 1. La protéine GCN2

La protéine GCN2 est une enzyme essentielle à l'organisme. Sa structure unique est composée de 5 domaines. L'interaction entre ses différents domaines rend son mécanisme d'activation complexe et quelques incertitudes subsistent. Son activation par autophosphorylation est induite par une accumulation d'ARN de transfert désacétylé et/ou une augmentation des protéines P de la tige du ribosome communément appelés les « P-stalk ». Le facteur principal déclenchant l'activation de GCN2 est le manque en acides aminés, mais d'autres facteurs peuvent aussi être impliqués.

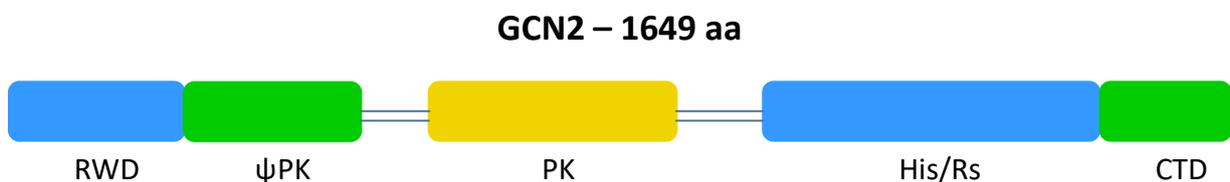
Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur le fonctionnement et la régulation de GCN2 avant d'étudier plus précisément les mécanismes cellulaires dans lesquels cette kinase est impliquée.

## 1.1 Généralités sur la protéine GCN2 : Structure, fonction et substrat de GCN2

### a) Structure de GCN2

L'enzyme GCN2 (General Control Non-derepressive 2) appartient à la famille des sérines thréonine-kinases. Elle est composée de 5 domaines (Figure 1) :

- RWD (*RING finger WD Repeat*)
- Pseudokinase ( $\psi$ PK)
- Domaine kinase (PK)
- Histidyl-tRNA Synthetase-like (HisRS)
- C-terminal (CTD)

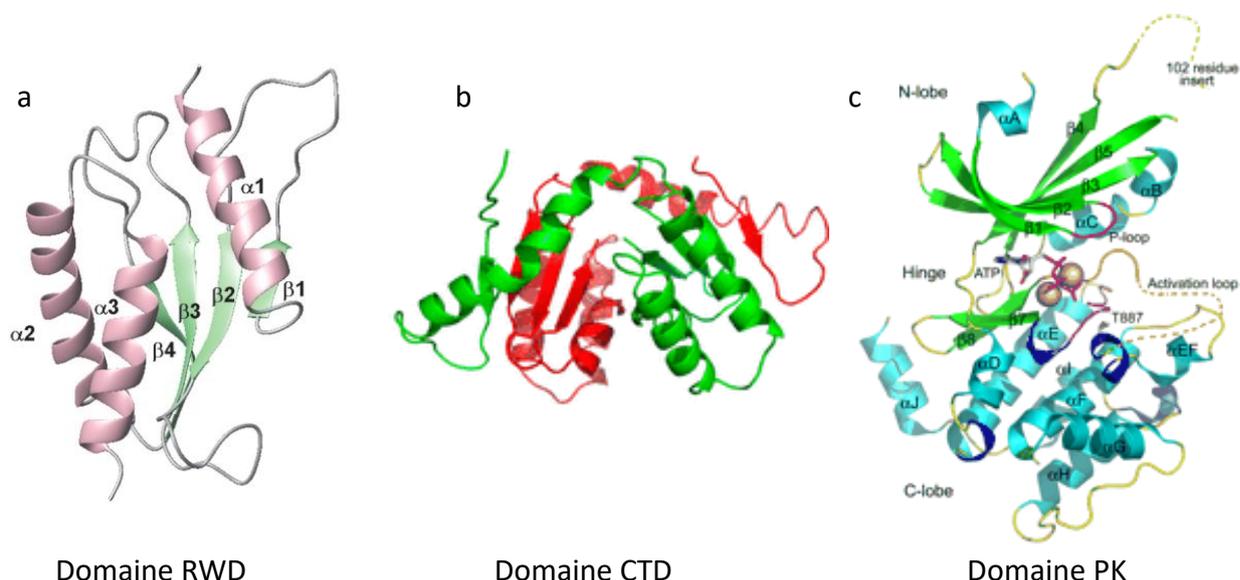


**Figure 1 : Domaines de la protéine sérine thréonine kinase GCN2 chez les mammifères**

Les polypeptides sont représentés par les barres épaisses colorées en partant du N- au C-terminal (de gauche à droite). RWD : site de liaison avec GCN1/GCN20,  $\psi$ PK : domaine de la pseudokinase, PK : Domaine de la kinase, His/Rs : domaine de l'histidyl-tARN synthetase, CTD (ou RB) : Ribosome binding. Les domaines impliqués dans la réponse au stress cellulaire sont en bleu, les domaines de la kinase sont en jaune. Le reste est en vert.

Une structure complète en 3 dimensions de GCN2 n'a pas encore été développée. Grâce aux techniques de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire (RMN), les structures des domaines de GCN2, sont individualisées et bien définies (Figure 2).

Le domaine RWD, placé en N-terminus de GCN2, contient une région essentielle pour l'interaction entre GCN2 et le complexe GCN1/GCN20. La structure du domaine RWD est très similaire entre les espèces mais le substrat permettant la liaison à GCN1 est différent<sup>1</sup>. GCN1 et GCN20 sont des protéines cytoplasmiques possédant une séquence interne très similaire aux facteurs d'élongation de traduction EF3. Cette séquence permet au complexe de transférer les ARN de transfert désacétylé du ribosome vers le domaine HisRS de GCN2<sup>2</sup>.



**Figure 2 : Les structures des différents domaines de la protéine GCN2**

a : La structure murine du domaine RWD est formée en "sandwich" avec deux couches : 4 brins antiparallèles en feuillet  $\beta$  en vert et 3 hélices en rose. b : La structure murine du domaine CTD divisée en deux polypeptides : le premier en vert est composé de trois brins  $\beta$  et trois hélices  $\alpha$ , le deuxième en rouge est composé de 4 brins  $\beta$  et trois hélices empaquetées. c : La structure murine du domaine PK, les hélices  $\alpha$  sont représentées en cyan, les brins  $\beta$  en vert. la molécule ATP est montrée en figure atomique dans le site d'activation de la protéine en interaction avec le site de phosphorylation (T887) et la boucle d'activation en pointillé jaune (issue de<sup>1 3 4</sup>)

Le domaine CTD placé en C-terminus de la protéine GCN2 permet la reconnaissance des ARN de transfert désacétylés (appelé aussi ARN de transfert non chargés) et des acides nucléiques

viraux. Néanmoins, ce domaine n'est pas aussi bien conservé que le domaine RWD. En effet, il semblerait que le domaine CTD de la levure soit capable de participer à l'association entre GCN2 et le ribosome, ce qui n'est pas le cas chez le mammifère<sup>3</sup>. Pour finir, le domaine kinase est le domaine d'activité catalytique de GCN2 présentant les deux sites de phosphorylation nécessaires à son activation. La structure du domaine kinase de GCN2 dans la levure a été développée dans un état actif puis un état inactif, ce afin de mieux comprendre le mécanisme d'activation de la kinase<sup>4</sup>.

## b) Fonction et substrat de GCN2

La protéine GCN2 est une protéine eucaryote ubiquitaire. Son poids moléculaire est de 210 kDa dans la levure<sup>5</sup> et de 186 kDa chez son homologue mammifère<sup>6</sup>. Le pourcentage d'identité entre GCN2 des mammifères et de la levure est faible (les mécanismes régulant la traduction semblent être les mêmes) mais la protéine GCN2 humaine peut remplacer GCN2 dans la levure et assurer sa fonction<sup>7</sup>. Elle est codée par le gène *EIF2AK4* (eukaryotic translation initiation factor 4). L'inducteur principal de cette protéine est la carence en acides aminés dans la cellule. Il semble néanmoins répondre à d'autres stimuli comme l'exposition aux UV ou une infection virale<sup>8</sup>. Ces différents inducteurs de GCN2 seront détaillés dans la partie 1.3 de ce chapitre.

Le substrat le plus étudié de GCN2 est le facteur d'initiation eIF2. Ce dernier est composé de trois sous-unités : la sous-unité  $\alpha$  de 36.1 kDa, la sous-unité  $\beta$  de 38.4 kDa et la sous-unité  $\gamma$  de 51.1 kDa. Lorsque la cellule est soumise à un stress métabolique (en particulier lors d'une carence en acides aminés), GCN2 phosphoryle la sérine 51 de la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2<sup>9</sup>.

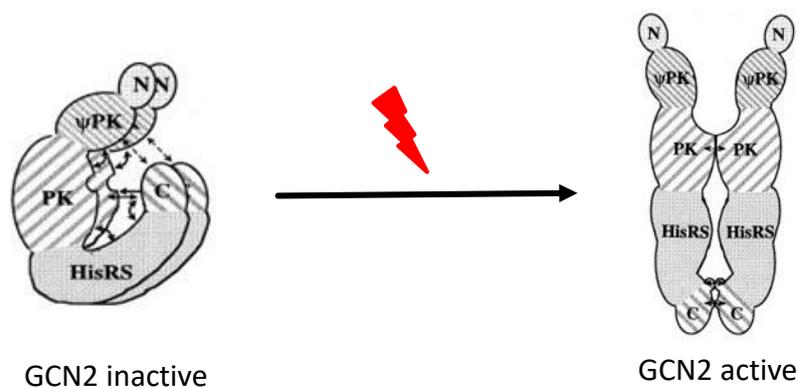
La methionyl-ARNt synthetase (MRS) fait aussi partie des substrats de GCN2<sup>10</sup>. Lors d'une dégradation de l'ADN, MRS est phosphorylée sur la sérine 662 par GCN2. MRS est une synthétase d'ARNt amino-acétylés, catalysant la formation de l'ARNt methionyl<sup>11</sup>. Cet ARNt appartient au complexe tertiaire (avec eIF2 et GTP) nécessaire à l'initiation de la traduction<sup>12</sup>. Les deux substrats de GCN2, eIF2 et MRS, sont deux protéines essentielles à l'initiation de la traduction protéique. Leurs phosphorylations par GCN2 induisent une diminution de la traduction générale des protéines<sup>13,10</sup>.

## 1.2. Les mécanismes d'activation et de régulation de GCN2

### a) Le mécanisme d'activation de GCN2

A l'état basal, GCN2 forme un homodimère inactif avec des interactions multiples entre le domaine CTD, His/RS et le domaine kinase<sup>14</sup>. L'activation de GCN2 est liée à un réarrangement structural et à la libération des interactions inhibitrices entre les domaines (Figure 3).

GCN2 est inactif lorsque les domaines de chaque monomère sont dans une position « proche ». L'inactivation de GCN2 est due, d'une part, aux interactions entre les lobes N et C de chaque monomère (ces régions sont particulièrement rigides) et d'autre part, aux interactions entre les domaines CTD stabilisés par les domaines HisRS de chaque monomère. GCN2 est dans une configuration « fermée » empêchant l'accès à la boucle catalytique de la protéine. À l'état actif, la rupture des liaisons hydrogène entourant la connexion entre les lobes N et C, augmente la flexibilité de cette région et permet de séparer les deux lobes. GCN2 est ainsi « ouverte » et l'accès aux sites actifs de GCN2 est libre<sup>4</sup>. L'autophosphorylation sur les Thr882 et Thr887 de Gcn2 levure ou sur les Thr898 and Thr903 pour GCN2 de mammifère est alors possible et l'activation de GCN2 est favorisée<sup>15</sup>.



#### Figure 3 : Modèle d'activation de GCN2 sous stress cellulaire

Interactions entre le domaine kinase et le domaine CTD, HisRS et pseudokinase contribuent au maintien du domaine kinase sous forme inactive à l'état basal. Ces interactions bloquent la dimérisation de GCN2 et son autophosphorylation. GCN2 est « fermée ». Sous stress cellulaire, un changement conformationnel est déclenché, dissociant le domaine CTD du domaine kinase (PK). Le dimère « ouvert » de GCN2 est alors formé et l'autophosphorylation de la kinase permet la phosphorylation de eIF2 $\alpha$ . (adaptée de <sup>16</sup>)

Différents régulateurs déclenchent la réorganisation de ces 5 domaines et l'activation de GCN2. Le plus connu est la liaison des ARN de transfert désacétylés (ARNt<sup>désat</sup>) au domaine HisRS de GCN2.

## b) Régulateur de GCN2 : les ARN de transfert désacétylés

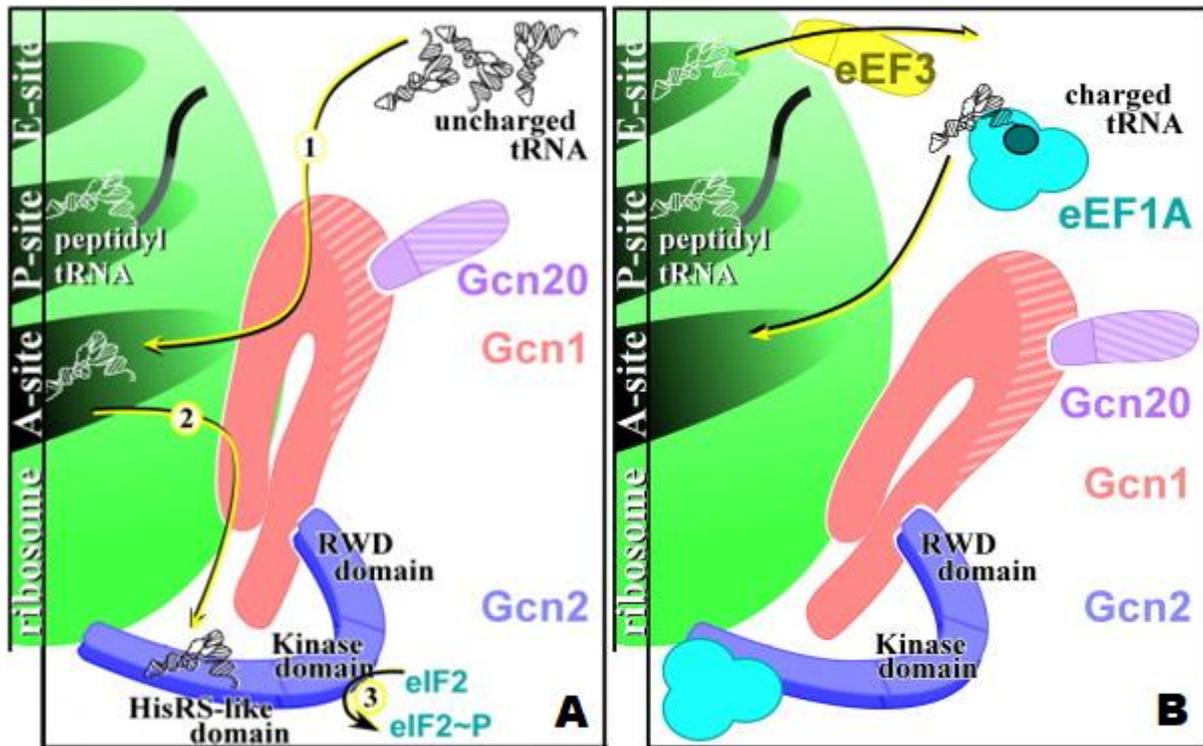
Le régulateur principal de l'activation de GCN2 est l'accumulation de l'ARNt<sup>désat</sup>. Une analyse par puce à ADN des cellules de levure a mis en évidence la corrélation directe entre la concentration en ARNt<sup>désat</sup> et l'activation de GCN2<sup>17</sup>. Ce résultat a aussi été confirmé in vivo chez la souris grâce à l'injection d'halofuginone. Celui-ci est un inhibiteur de la prolyl-ARNt synthétase. L'halofuginone déclenche alors une accumulation d'ARNt<sup>désat</sup>. L'analyse des différentes voies de signalisation ont montré l'activation de Gcn2 chez les souris injectées à l'halofuginone<sup>18</sup>.

L'interaction entre GCN2 et les ARNt<sup>désat</sup> est dépendante du domaine His/RS et du domaine CTD<sup>19</sup>. Le mécanisme d'activation de GCN2 par les ARNt<sup>désat</sup> a été particulièrement étudié sur la levure. Celui-ci requiert deux autres facteurs : GCN1 et GCN20 (General control non-derepressible 1 et 20). GCN1 possède une séquence homologue au domaine N-terminal du facteur d'élongation eucaryote (eEF3)<sup>20</sup>. Les protéines GCN2 et GCN1 s'associent l'une avec l'autre grâce aux domaines RWD de GCN2 et le C-terminal de GCN1<sup>21</sup>.

Si GCN20 a été identifié pour la première fois dans la levure<sup>22</sup>, son orthologue chez le mammifère n'a pas encore été trouvé. En revanche, comme GCN1, GCN20 partage une homologie avec eEF3 et possède un rôle important dans l'étape d'élongation de la traduction. En effet, en conditions basales, il permet la libération des ARNt<sup>désat</sup> liés au site E du ribosome. Lors du processus d'élongation, les ARNt aminoacétylés sont d'abord captés par le site A du ribosome permettant la formation des liaisons peptidiques dans le site P. Le site E permet ensuite la libération des ARNt<sup>désat</sup>.

Cette homologie entre eEF3 et GCN1/GCN20 a permis d'émettre l'hypothèse suivante : le complexe GCN1/GCN20 possède la même fonction que eEF3. Lors d'une accumulation d'ARNt<sup>désat</sup>, le complexe GCN1/GCN20 libère les ARNt<sup>désat</sup> permettant ainsi le transfert des ARNt<sup>désat</sup> du site A vers le domaine His/RS de GCN2 déclenchant ainsi son activation (Figure 4)<sup>23</sup>. Néanmoins, ce mécanisme d'activation est validé sur la levure mais ces résultats n'ont

jamais été reproduits dans la cellule eucaryote. Il n'est pas encore montré que les ARN<sup>désat</sup> peuvent occuper les sites A des ribosomes eucaryotes.



**Figure 4 : Comparaison entre le mécanisme d'activation de GCN2 par l'accumulation des ARN<sup>désat</sup> avec le mécanisme d'élongation des ARNt acétylés dans la levure**

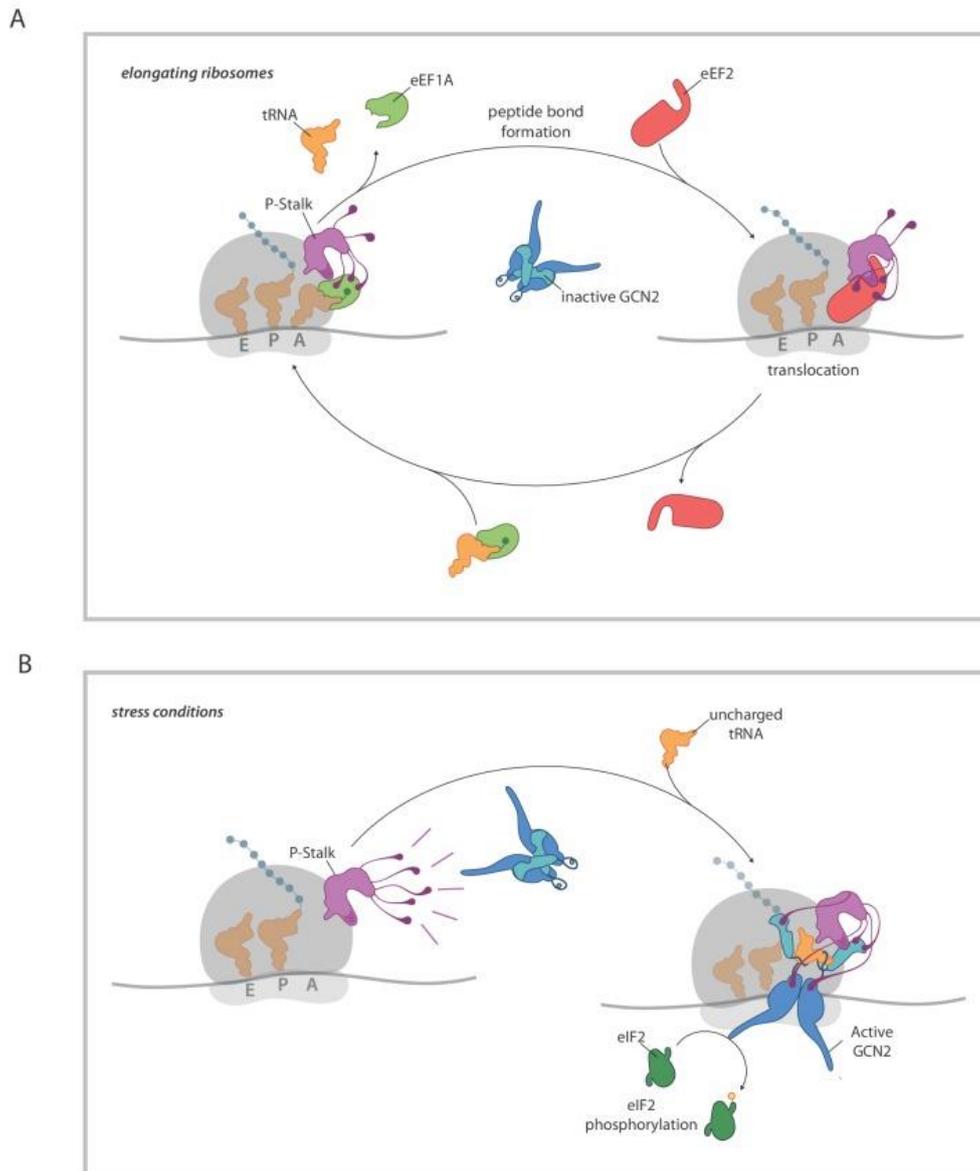
**A :** GCN1/GCN20 se lie au ribosome et au domaine RWD de GCN2. 1) Sous condition de stress, une accumulation des ARN<sup>désat</sup> (ARN non chargé) est observée. Ces ARN<sup>désat</sup> sont capturés dans le site A du ribosome. 2) Ces ARN<sup>désat</sup> sont ensuite transférés au domaine His/RS de GCN2 via le complexe GCN1/GCN20. 3) activant ainsi l'activation de GCN2 et la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Le domaine de liaison entre GCN1/GCN20 n'est encore établi. **B :** En condition basales, les ARNt sont amino-acétylés (ARN chargés). Le site A capte ces ARNt grâce à la protéase eEF1A puis le site P permet la formation du polypeptide. Le site E favorise alors la sortie des ARN désacétylés grâce à la protéase eEF3. (adaptée de <sup>23</sup>).

Des récentes études ont cependant montré la faible affinité de GCN2 humaine avec les ARN<sup>désat</sup>. Ces résultats suggèrent donc l'ajout d'un facteur de régulation permettant l'activation : le ribosome et les protéines P.

### c) Régulateur de GCN2 : les ribosomes et les protéines P

Il a été montré que GCN2 pouvait être activée par un dérèglement traductionnel en absence et en présence de ARN<sup>désat</sup>. Ce résultat suggère un mécanisme alternatif d'activation de

GCN2, mécanisme qui serait guidé par l'activation ribosomique<sup>24</sup>. Ce mécanisme d'activation semble être différent pour la levure et le mammifère. En effet, dans la levure, il a été démontré que Gcn2 interagissait avec les ribosomes via son domaine CTD<sup>25</sup>. Cette interaction n'a pas été retrouvée chez la souris<sup>3</sup>. Cependant, une étude a démontré que GCN2 humaine se liait au ribosome de lapin<sup>26</sup>. Cette diversité de résultat peut être due à la différence entre les mécanismes employés dans les levures et les différents mammifères. Chez l'humain, il semblerait que GCN2 interagisse avec la tige du ribosome appelée « P-stalk »<sup>26</sup>. Cette région du ribosome, appartenant à la grande sous-unité ribosomique, est localisée sur la partie supérieure du site A. Elle est constituée d'une protéine ul10 (aussi appelé P0) et de deux protéines appelées P1 et P2. « P-Stalk » est un complexe dynamique : ul10 est constamment relié au ribosome tandis que les protéines P1 et P2 oscillent entre un état stable lié au ribosome et un état mobile dans le cytoplasme<sup>27</sup>. Chaque protéine du « P-stalk » possède une extrémité C-terminale, nommée CTTs (C-terminal tails). Ceux-ci sont capables de se lier aux facteurs de traduction (comme eEF1, eEF2 et eEF3) impliquant ainsi le complexe « P-stalk » dans le processus d'élongation. Chez l'humain, le complexe « P-stalk » du ribosome est capable de stimuler GCN2 en l'absence d'ARN<sup>désat</sup>. Il a été montré que les CTTs des protéines P1 et P2 sont essentielles à cette activation<sup>26</sup>. Cette activation semble être liée au ralentissement et à la stabilisation du ribosome. En effet, une corrélation entre le ralentissement du ribosome et l'augmentation de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par GCN2 a été mise en évidence<sup>24</sup>. Il a été suggéré un mécanisme d'activation de GCN2 dans les conditions de stress métabolique. Sous stress métabolique, le cycle traductionnel est altéré, le ribosome est stabilisé perturbant ainsi l'étape d'élongation. Les facteurs d'élongation ne se lient plus aux CTTs du complexe « P-stalk ». Les CTTs, ainsi libres, sont capables d'activer GCN2 (Figure 5).



### Figure 5 : Schémas de l'activation de GCN2 par le complexe "P-stalk" sous stress métabolique

A : A l'état basal, GCN2 est inactif. Son état inactif est maintenu par l'interaction entre les CCTs du « P-Stalk » et les protéines impliquées dans la traduction (eEF1 et les ARNt chargés). Le processus d'élongation peut ainsi se dérouler via eEF2. B : Sous stress, et en particulier lors d'une carence en acide aminé, une accumulation d'ARN<sup>désat</sup> est enregistrée. Les CCTs du P-stalk ne peuvent plus se lier à eEF1A et aux ARNt chargés. Ils sont alors libres d'activer GCN2. Cette liaison entre le « P-Stalk » et la kinase, implique un changement de conformation des différents domaines de GCN2 (PK, His/RS et CTD). Ici, il est supposé que les ARN<sup>désat</sup> viennent en complémentarité du « P-stalk » pour la phosphorylation d'eIF2 (issue de <sup>28</sup>)

Le degré d'activation de GCN2 par les ribosomes et le complexe « P-stalk » est même supérieur à celui des ARNt<sup>désat</sup> <sup>26</sup>. Les deux mécanismes d'activation de GCN2 par les ARNt<sup>désat</sup> ou les « P-stalk » du ribosome ne semblent pas incompatibles. Leur relation, de complémentarité ou de compétition, n'est pas encore établie.

### 1.3. La réponse de GCN2 à un stress métabolique

La protéine GCN2 est activée dans certaines conditions physiologiques de la cellule. Ces différents régulateurs sont associés aux stress métaboliques, en particulier lors d'une carence en acides aminés. L'activation de GCN2 permet le déclenchement de l'ISR (*Integrated Stress Response*). Cette voie vise à ralentir le processus global de traduction de protéine tout en ciblant la traduction de certaines protéines capables de répondre au stress induit. Ces protéines vont par la suite, déclencher des processus de survie ou de mort cellulaire.

#### a) GCN2, un détecteur du manque en acides aminés

La cause biologique la plus connue déclenchant l'activation de GCN2 est le manque en acides aminés. Chez les mammifères comme dans la levure une carence en acides aminés active GCN2 via une accumulation des ARNt<sup>désat</sup>. En effet, à cause du manque en acides aminés, l'enzyme ARN synthétase échoue dans l'amino-acétylation de l'ARN de transfert, augmentant ainsi la proportion de ARNt<sup>désat</sup>. Les expérimentations sur la levure ont montré que le niveau d'activation de GCN2, lors d'une carence en acides aminés, était directement relié à l'augmentation des ARNt<sup>désat</sup><sup>29</sup>. Chez le mammifère, une étude a mis en exergue l'importance de GCN2 dans l'apport alimentaire des souris. Lorsque les souris sont soumises à un régime alimentaire déplété en acides aminés essentiels, GCN2 participe au mécanisme de défense pour répondre au stress nutritionnel. En effet, via une activation par les ARN<sup>désat</sup>, GCN2 permet à la souris de sélectionner la nourriture permettant de combler le manque en acides aminés<sup>30</sup>. La protéine GCN2 est ainsi un détecteur de manque en acides aminés chez la levure et le mammifère.

Par ailleurs, GCN2 peut aussi être activée par le complexe « P-stalk » du ribosome. Lors d'un déficit en acides aminés, le cycle traductionnel des protéines est altéré. En effet, la diminution des ARNt<sup>désat</sup> disponibles pour l'élongation, aboutit au ralentissement et/ou la stabilisation du ribosome<sup>26</sup>. Comme expliqué dans la partie 1.2.c, la stabilisation du ribosome peut activer GCN2 via son complexe « P-stalk ».

Le manque en acides aminés semble ainsi activer GCN2 via les deux mécanismes de régulation décrits précédemment : les ARN<sup>désat</sup> et le complexe « P-stalk ». Aucune étude ne montre si une voie est favorisée par rapport à une autre.

Différents modèles ont prouvé le rôle protecteur de GCN2 lors d'une carence en acides aminés. Par exemple chez les souris *Gcn2<sup>-/-</sup>*, lorsque la mère est privée d'acides aminés essentiels dans son alimentation, la mortalité est considérablement augmentée chez les souriceaux *Gcn2<sup>-/-</sup>* par rapport au wild-type (WT)<sup>31</sup>. Ces résultats sont cohérents avec l'expérience réalisée par l'équipe de Tracy G. Anthony qui a montré qu'un régime déplété en leucine (acide aminé essentiel) induit la mort des souris *Gcn2<sup>-/-</sup>* six jours après le début du régime. En revanche, malgré une perte de poids, les souris WT sous régime privé en leucine sont saines.

Les régimes ne sont pas les seules méthodes pour dépléter l'organisme en acide aminé. L'asparaginase, un traitement utilisé en chimiothérapie contre la leucémie aigüe lymphoblastique, déplete les cellules en asparagine. Les souris *Gcn2<sup>-/-</sup>*, injectées avec de l'asparaginase maigrissent drastiquement (diminution de 14% de leur masse corporelle 6 jours après l'injection, contrairement aux souris WT) et développent un stéatose du foie<sup>32</sup>. Enfin des conditions physiopathologiques peuvent induire une carence en acides aminés, comme c'est le cas pour l'inflammation. Par exemple, lors d'un stress inflammatoire, la voie IDO1 est activée, entraînant la consommation de tryptophane et ainsi l'activation de GCN2<sup>33</sup>. L'interaction entre GCN2 et le système immunitaire est détaillée dans la partie 1.4.

D'autres conditions qui semblent à première vue non corrélées au manque en acides aminés, peuvent aboutir à l'activation de GCN2. C'est le cas pour un déficit en nutriments différents des acides aminés : Dans la levure, le manque en glucose et en purine déclenche l'activation de GCN2<sup>34 35</sup>. Une augmentation de l'acidité dans la cellule implique aussi une accumulation des ARNt désacétylés activant ainsi GCN2<sup>36</sup>. Certaines études ont aussi montré l'activation de GCN2 lors d'une exposition aux UV<sup>37</sup> ou d'une infection virale<sup>39,40</sup>.

L'activation de GCN2 permet à la cellule de répondre au stress induit par un manque en acides aminés ou un autre facteur décrit dans le paragraphe ci-dessus. Cette activation permet le déclenchement de l'ISR. Cette voie vise à ralentir le processus global de traduction de protéine tout en ciblant la traduction de certaines protéines capables de répondre au stress induit. Ces protéines vont par la suite, déclencher des processus de survie ou de mort cellulaire.

## b) L'ISR

*Integrated stress response* (ISR) est l'une des voies de signalisation les plus importantes de la cellule eucaryote. Ce processus de défense est déterminant pour l'adaptation de la cellule au stress. GCN2 joue un rôle primordial dans l'ISR puisqu'elle fait partie des quatre kinases capables de déclencher l'ISR.

Ce processus (décrit en détail ci-dessous) est bien connu mais la diversité des conséquences de son activation sont diverses et peuvent être néfastes pour la cellule si elles ne sont pas bien régulées.

L'ISR est composée d'une famille de quatre sérine-thréonine kinases<sup>41</sup> :

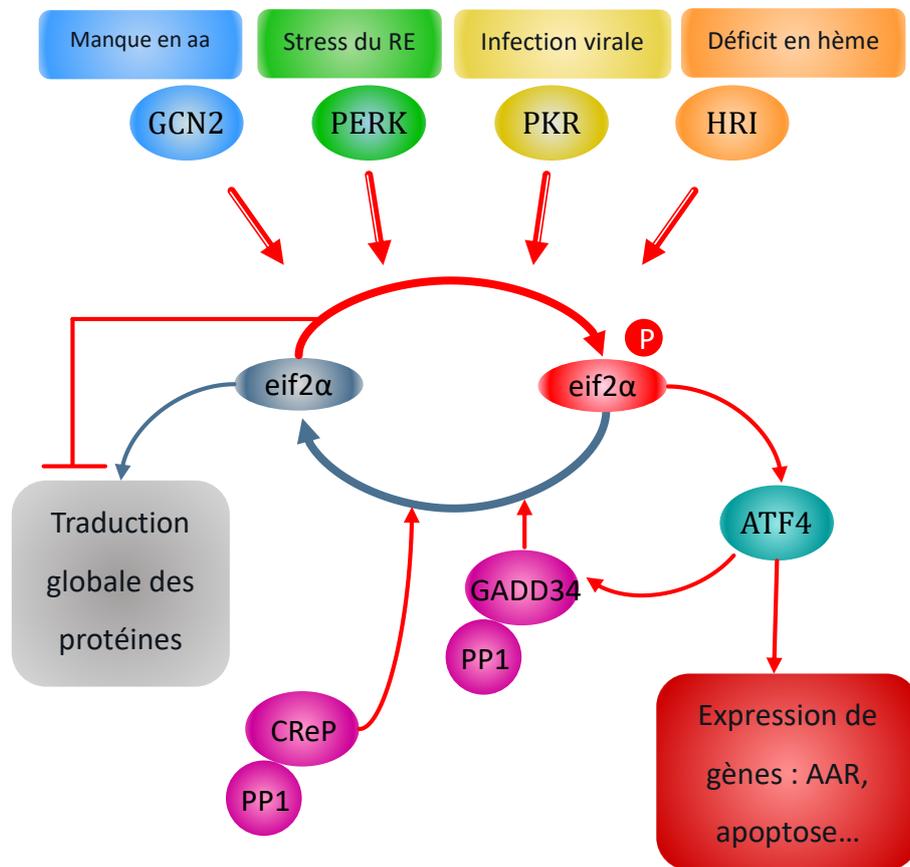
- PKR (*double-stranded RNA-activated protein kinase*)
- PERK (*PKR like endoplasmic reticulum kinase*)
- HRI (*Heme-Regulated eIF2 $\alpha$  kinase*)
- GCN2

Chacune de ces kinases déclenche l'ISR suite à un stress cellulaire particulier : PERK est activé par le stress du réticulum endoplasmique<sup>42</sup>, HRI par la carence en hème<sup>43</sup>, PKR par les ARN double brin<sup>44</sup> et GCN2 par le manque en acides aminés<sup>45</sup>.

En réponse à leur stress métabolique respectif, chacune d'entre elles va phosphoryler la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 à la serine 51. La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  a pour conséquence une inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction, entraînant une forte inhibition de la synthèse protéique<sup>46</sup>.

L'ISR impacte ainsi la cellule à différents niveaux. Tout d'abord, elle ralentit la vitesse d'initiation à la traduction et diminue la quantité globale de protéines synthétisées. Ensuite, elle permet l'activation d'un programme d'expression génique spécifique via l'induction du facteur de transcription ATF4. L'activation de la voie eIF2 $\alpha$ /ATF4 lors d'un déficit en acides aminés, peut alors induire la transcription de gènes cibles spécifiques impliqués dans : la biosynthèse et le transport des acides aminés, la réponse au stress oxydant, l'apoptose et l'autophagie<sup>46</sup>. La terminaison de l'ISR commence par la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$  et permet de restaurer la synthèse des protéines et le bon fonctionnement de la cellule. Ce mécanisme est régulé par deux complexes : la protéine GADD34, elle-même induite par ATF4,

en complexe avec la protéine phosphatase 1 (PP1) ou l'association de protéines PP1/CReP. Ceux-ci activent le rétrocontrôle négatif de l'ISR et permettent le retour à l'homéostasie (Figure 6) <sup>47,48</sup>.



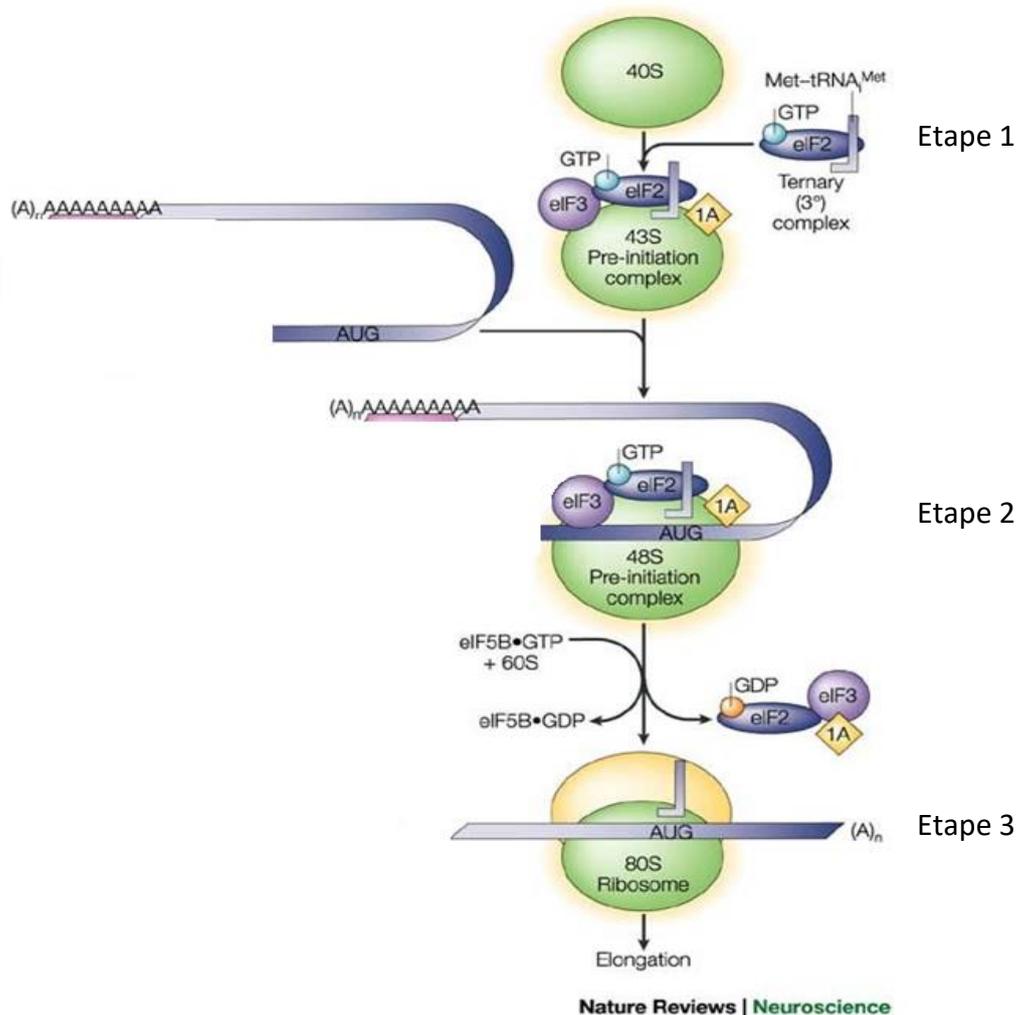
**Figure 6 : Mécanismes de l'ISR (l'Integrated Stress Response)**

Chaque stress métabolique active une des quatre kinases de l'ISR (GCN2, PERK, PKR et HRI) qui va par la suite phosphoryler eif2α. Cela conduit à une atténuation de la traduction globale des protéines favorisant la traduction de mARN spécifiques de l'ISR comme ATF4. ATF4 est l'acteur principal de l'ISR. Il induit l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire. Le mécanisme de rétrocontrôle négatif de l'ISR est régulé par deux complexes : CReP-PP1 ou GADD34-PP1. Elles déphosphorylent eif2α permettant la reprise de la traduction globale des protéines. Les flèches en rouge représentent les mécanismes activés sous stress, les flèches en gris, les mécanismes à l'état basal.

- Phosphorylation d'eif2α et inhibition de la traduction globale de protéines

Le processus de traduction est divisé en trois phases distinctes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation est l'étape limitante pour la régulation de la traduction. Il est plus efficace d'interrompre un processus biologique à son commencement plutôt que de l'interrompre et faire face à une synthèse de protéines aberrantes<sup>49</sup>. L'étape d'initiation permet l'association du ribosome au codon d'initiation (AUG) de l'ARN messager. Elle peut être divisée en trois étapes. Tout d'abord, l'ARN de transfert-méthionyle (ARN<sub>t</sub><sup>Met</sup>) se lie à la

sous-unité ribosomique 40S pour former le complexe pré-initiation 43S. Ensuite, ce complexe se lie à l'ARNm pour former un nouveau complexe 48S, capable de scanner le codon d'initiation AUG. Enfin, dans cette première étape d'initiation, la sous unité 60S ribosomique s'associe au complexe 48S pour former le complexe final 80S ribosomique. L'étape d'élongation permettant la formation de la chaîne polypeptidique, peut ainsi commencer. En phosphorylant la sous-unité  $\alpha$  d'eIF2, GCN2 inhibe ainsi l'initiation de la traduction protéique. EIF2 est ainsi une protéine essentielle à l'initiation de la traduction car la liaison entre la sous-unité ribosomique 40S et l'ARNm est guidée par le complexe : eIF2-GTP-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> (Figure 7).

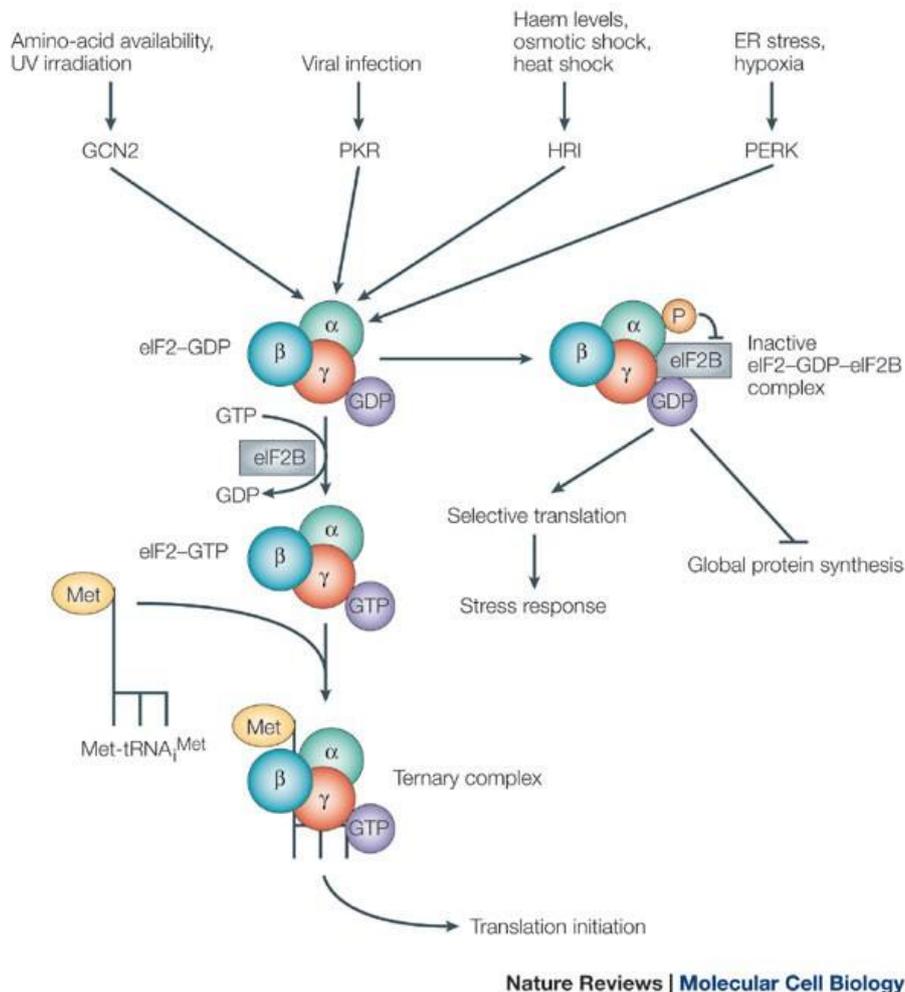


**Figure 7 : Schéma de l'étape d'initiation de la traduction des protéines**

L'étape d'initiation est subdivisée en 3 étapes successives :

1) Le complexe tertiaire (eIF2-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-GTP) se lie au complexe 40S pour former le complexe de pré-initiation 43S. 2) Le complexe 43S peut scanner l'ARNm en reconnaissant le codon d'initiation AUG. L'ensemble forme le complexe 48S. 3) Le complexe tertiaire est substitué par la sous-unité 60S ribosomique. L'association entre le ribosome et l'ARNm, forme le complexe 80S (issue de <sup>50</sup>)

Le facteur eIF2B catalyse l'échange du GDP pour un GTP et permet ainsi la formation du complexe. En condition de stress, la sous-unité  $\alpha$  de eIF2 est phosphorylée en position Ser51. Cette phosphorylation inhibe l'étape d'initiation de la traduction pour deux raisons. Tout d'abord, la phosphorylation empêche l'échange GTP-GDP nécessaire à la formation du complexe eIF2-GTP-ARNti Met<sup>51</sup>. Ensuite, eIF2 $\alpha$  phosphorylé inhibe eIF2B en devenant un compétiteur ; la concentration d'eIF2 est en excès par rapport à celle d'eIF2B. Ainsi, sa phosphorylation inhibe quantitativement eIF2B<sup>52</sup> (Figure 8). L'inhibition de eIF2 $\alpha$  phosphorylé est essentielle dans la régulation traductionnelle en condition de stress cellulaire.



**Figure 8 : Schéma de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes.**

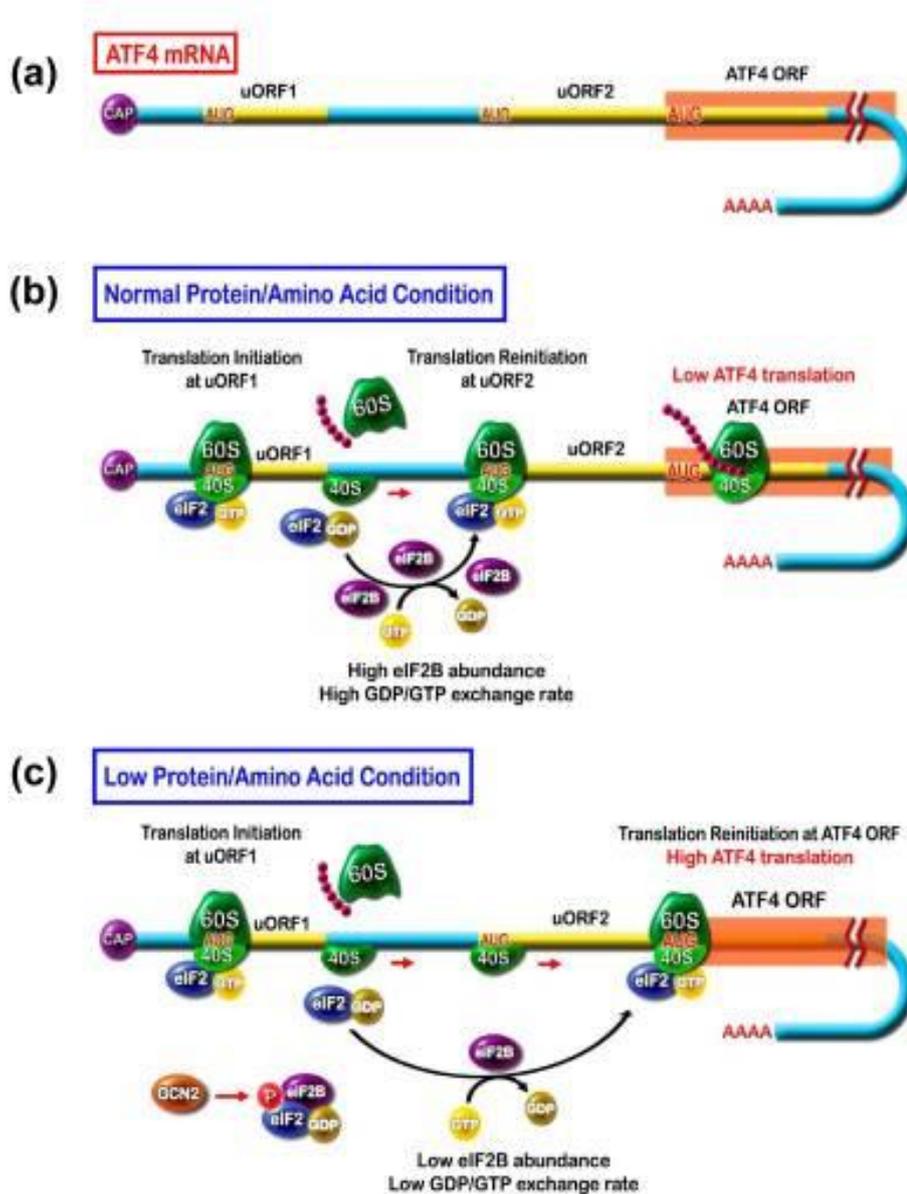
eIF2 appartient au complexe ternaire (eIF2-GTP-Met-ARNti Met) et doit être rechargé en GTP pour pouvoir initier la traduction. Ce rechargement est réalisé par le facteur eIF2B. Lorsque la cellule est soumise à un stress métabolique, l'initiation à la traduction est ralentie en raison de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha$  de eIF2 (issue de <sup>53</sup>)

La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  induit un ralentissement de l'initiation de la traduction des protéines. Ce mécanisme est déclenché afin de traduire sélectivement des ARNm codants pour des protéines capables de répondre au stress induit (décrit dans le paragraphe suivant). Par conséquent les ARNm restants recrutent des protéines spécifiques appelées les ribonucléoprotéines (RBPs). En fonction des RBPs recrutées, soit les ARNm s'accumulent dans les granules de stress où ils pourront être soumis à la traduction ultérieurement, soit les ARNm migrent vers les corps P (plus communément appelés *P bodies*) pour être dégradés<sup>54,55</sup>.

- Traduction sélective d'ARNm

La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  réduit la traduction de la majorité des ARNm. Cependant, cette phosphorylation va aussi, paradoxalement, favoriser la traduction de certains ARNm. Ceux-ci codent des protéines capables de répondre au stress induit<sup>41</sup>. Parmi ces ARNm, se trouvent ATF5 (Activating Transcription Factor 5)<sup>56</sup>, GADD34 (growth arrest and DNA damage)<sup>57</sup> et ATF4 (Activating Transcription Factor 4)<sup>58</sup>. Ces ARNm renferment dans leurs séquences de courtes phases ouvertes de lecture, appelées en anglais « upstream open reading frame » (uORFs) dans la région 5' non traduite (5'-UTR) précédant la séquence codante fonctionnelle.

Plusieurs de ces ARNm sont répertoriés dans la littérature, le plus décrit est l'ARNm d'ATF4. Celui-ci contient deux uORFs (uORF1 et uORF2). En conditions basales, les niveaux du complexe eIF2-GTP-Met-ARNti sont élevés, les ribosomes peuvent ainsi traduire l'uORF1 dans la région 5'UTR puis initier la traduction du polypeptide de 60 acides aminés sur l'uORF2. La séquence de uORF2 chevauche la séquence codante d'ATF4. Ainsi, la traduction de l'uORF2 empêche la traduction de l'ORF codant pour ATF4. Très peu d'ATF4 est donc traduit. En condition de stress, il y a une diminution de l'initiation de la traduction car le niveau de eIF2-GTP est faible. Après avoir terminé la traduction de l'uORF1, les ribosomes ne sont pas rechargés avec eIF2-GTP- Met-ARNti quand ils atteignent l'AUG de l'uORF2. En conséquence, la probabilité de la traduction de l'uORF2 chute et celle d'ATF4 augmente (Figure 9)<sup>59</sup>.



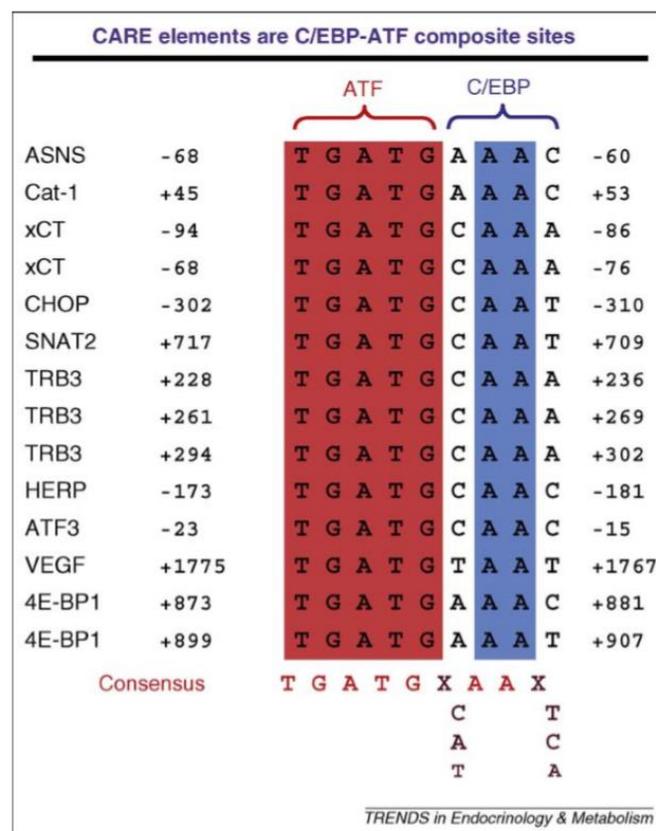
**Figure 9 : Régulation de la traduction d'ATF4 en réponse à la carence en acides aminés**

(a) La structure de l'ARNm d'ATF4 chez l'homme contient deux uORFs. L'uORF2 chevauche la séquence codante d'ATF4. (b) En condition de concentration normale en protéines et/ou en acides aminés, les ribosomes initient la traduction de l'uORF2. Après l'avoir traduit, la ré-initiation de la traduction, possible par un haut niveau de eIF2-GTP, va se faire au niveau de l'uORF2. La synthèse d'ATF4 sera alors faible. (c) Lors d'une faible concentration en acides aminés ou en protéines, la phosphorylation d'eIF2 va diminuer fortement la ré-initiation de la traduction après l'uORF1. La probabilité de réinitier la traduction avant d'atteindre l'uORF2 sera faible. Dans ce cas, les ribosomes vont parvenir à l'ORF codant pour ATF4. Ce facteur sera traduit et son expression pourra augmenter (issue de <sup>60</sup>)

Dans ces conditions, la traduction du message du facteur de transcription ATF4 est augmentée. ATF4 peut alors induire la transcription de gènes cibles possédant dans leur promoteur des éléments de réponse au stress soumis à la cellule<sup>61</sup>.

### c) Amino Acid Response (AAR)

Dans les conditions de déficit en acides aminés, l'activation de l'ISR par GCN2 permet à la cellule de réduire son besoin en acides aminés pour la synthèse de protéines. L'augmentation de la traduction d'ATF4 va permettre l'expression de gènes spécifiques de l'AAR (*Amino Acid Response*). Les gènes de l'AAR possèdent une séquence régulatrice appelée CARE (CCAAT-enhancer binding protein-activating transcription factor (C/EBP-ATF) response elements). Elle est nommée ainsi car elle est composée sur sa première moitié d'un site consensus de fixation d'ATF4, conservé, et sur la deuxième moitié de sa séquence, d'un site consensus de la fixation de la famille des protéines C/EBP-ATF, différent en fonction du gène (Figure 10).



**Figure 10 : Exemple de gènes possédant la séquence CARE (C/EBP-ATF response elements).**

En rouge : le site de fixation d'ATF4, conservé entre les gènes.

En bleu : le site de fixation des protéines C/EBP-ATF, différent selon les gènes. 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1; ASNS, asparagine synthetase; ATF3, activating transcription factor 3; Cat-1, cationic amino acid transporter 1; CHOP, C/EBP homology protein; HERP, homocysteine-induced ER protein; SNAT2, System A neutral amino acid transporter 2; TRB3, Tribbles 3; VEGF, vascular endothelial growth factor; xCT, sodium-independent aspartate/glutamate/cystine transporter (issue de <sup>60</sup>)

Suite à l'activation de l'ISR par GCN2, ATF4 se lie aux séquences CARE de ces gènes, via la séquence de liaison ATF, probablement en hétérodimère avec des membres de famille C/EBP<sup>62 63</sup>. L'identité de ces hétérodimères n'a pas encore été établie. GCN2 est ainsi essentiel au déclenchement de l'AAR suite à un manque en acides aminés<sup>64</sup>. Les gènes induits de l'AAR permettent à la cellule de répondre au stress induit. Des centaines de gènes de l'AAR ont été identifiés<sup>65</sup>.

Parmi les gènes induits par ATF4, on retrouve ASNS<sup>66</sup>, ATF3<sup>67</sup>, SNAT2<sup>68</sup> et CAT-1<sup>69</sup> qui par la suite, agissent en contre-régulateurs du signal. Le gène ASNS code pour l'enzyme asparagine synthétase. Cette dernière catalyse la conversion de l'aspartate et glutamine en asparagine et glutamate, fournissant à la cellule un nouvel apport en glutamine et en asparagine<sup>70</sup>. ATF3 est un facteur de transcription connu comme étant un carrefour important des différentes réponses au stress cellulaire. ATF3 joue un rôle important dans l'immunité innée. Cette protéine agit comme un régulateur négatif du Toll-like receptor 4 (TLR4) dans les macrophages diminuant ainsi l'expression des gènes pro-inflammatoires<sup>71</sup>. Les gènes SNAT2 et CAT-1 codent pour des transporteurs en acides aminés respectivement neutres ou cationiques. L'augmentation de transcription de ces gènes permettent ainsi à la cellule d'absorber activement des acides aminés et de s'adapter au manque des acides aminés extracellulaires<sup>72</sup>.

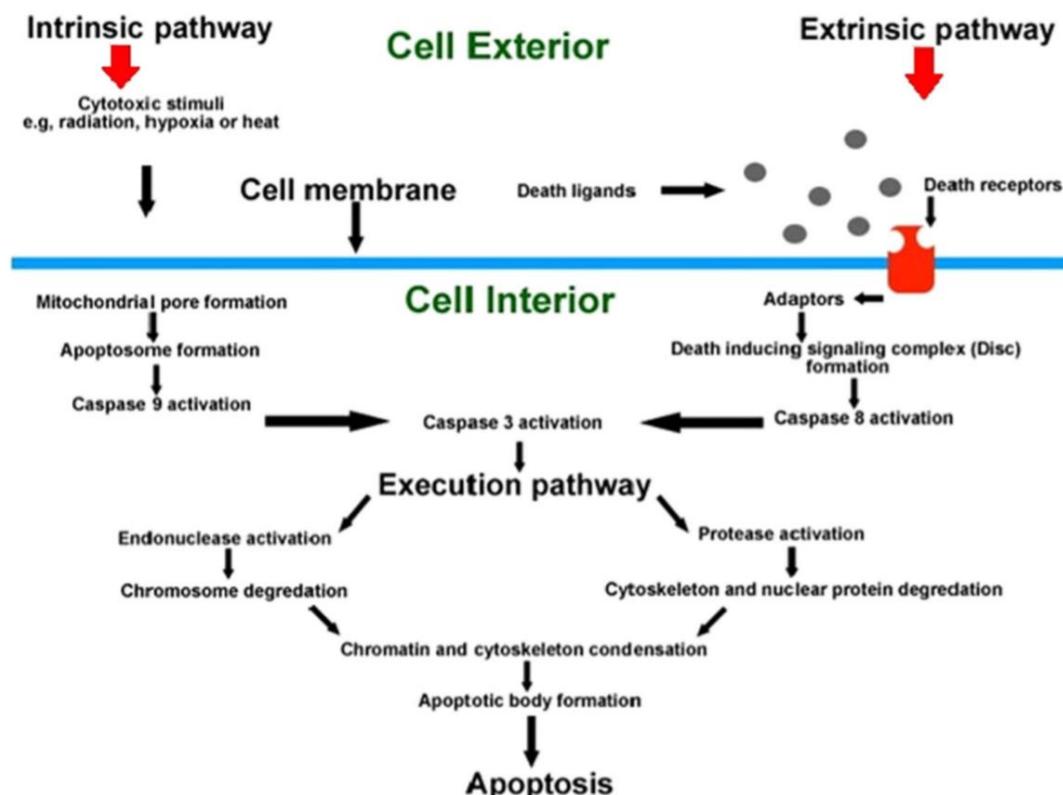
Comme évoqué précédemment (partie 1.3.a), l'asparaginase est une enzyme utilisée pour traiter la leucémie lymphoblastique aigue. Cette enzyme déplete les cellules tumorales en asparagine et glutamine, induisant leur mort cellulaire<sup>73</sup>. Le problème est que ce traitement déplete aussi les cellules des autres organes en asparagine. Le foie y est particulièrement sensible<sup>74</sup>. Les souris déplétées en GCN2 sous asparaginase, présentent une forte augmentation de l'inflammation dans le foie aboutissant à des lésions hépatiques. Il a été montré que GCN2, via l'AAR, permet de protéger le foie de la toxicité liée à l'asparaginase<sup>32</sup>.

#### d) Apoptose

Le mot apoptose est utilisé pour la première fois en 1972 par l'équipe du Dr Kerr, Wyllie et Currie pour décrire un type de mort cellulaire<sup>75</sup>. L'apoptose est un processus qui empêche la cellule de croître et de se diviser pour favoriser la mort cellulaire sans fuite de son contenu dans la matrice extracellulaire. L'apoptose fait souvent référence à une mort cellulaire programmée surnommée : « le suicide cellulaire ».

- Définition

L'initiation de l'apoptose est dépendante de l'activation d'une série de caspases. Il existe deux catégories de caspases : les caspases initiatrices (caspases 8 et 9) et les caspases exécutrices (caspases 3, 6 et 7). Lorsque les dommages cellulaires sont détectés, les caspases initiatrices sont activées et déclenchent les caspases exécutrices. Cette activation déclenche une cascade d'évènements aboutissant à la fragmentation de l'ADN, la destruction des protéines nucléaires et cytosquelettiques, une expression des ligands pour les cellules phagocytaires et la formation de corps apoptotiques. Contrairement à la nécrose qui est une mort non programmée, l'apoptose peut être initiée par la cellule elle-même grâce à des capteurs intracellulaires. C'est l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Cependant, l'apoptose peut aussi être déclenchée par une interaction entre les cellules endommagées et les cellules immunitaires, initiant ainsi la voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 11). Les deux voies sont utilisées par l'organisme afin de maintenir une homéostasie cellulaire et d'éliminer les cellules défectueuses du corps humain.



**Figure 11 : Résumé des composants majoritaires de la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.** La voie intrinsèque est déclenchée par la cellule elle-même tandis que la voie extrinsèque est initiée par les cellules immunitaires. Les deux voies convergent vers l'activation de la caspase 3, déclenchant la mort cellulaire. (issue de <sup>76</sup>)

Plusieurs études ont montré les interactions entre l'activation de GCN2 et le déclenchement de l'apoptose, en particulier dans le cas d'un manque en acides aminés. En fonction du contexte cellulaire et des facteurs de l'environnement, GCN2 peut revêtir un rôle anti-apoptotique ou pro-apoptotique.

- Processus anti-apoptotique

L'activation de l'ISR par GCN2 permet à la cellule de « récupérer » en ralentissant la traduction globale des protéines. Le premier objectif de GCN2 est donc anti-apoptotique. Il a tout d'abord été démontré que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par GCN2 assure une résistance à l'apoptose en réponse à une exposition aux UV via l'activation de la voie NF-kB<sup>77</sup>. Il a aussi été démontré que NF-kB augmente l'expression de gène anti-apoptotique favorisant ainsi le développement de tumeurs malignes<sup>78</sup>. Dans ce cas, GCN2 protège aussi les cellules des effets néfastes de l'exposition aux UV. Lors d'un manque en acide aminés, la voie GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4 est utilisée par les cellules tumorales afin de survivre et de maintenir leur homéostasie. GCN2 possède ainsi un rôle important dans la résistance à l'apoptose<sup>79</sup>.

- Processus pro-apoptotique

Si les cellules sont capables de survivre à des carences en acides aminés de courte durée en régulant les mécanismes de la synthèse protéique ou de l'AAR, une carence prolongée n'est pas viable<sup>80</sup>. Plusieurs études ont pointé l'importance du rôle de GCN2 dans le déclenchement des processus pro-apoptotiques, en réponse à différents stress comme : une déplétion en glucose<sup>81</sup>, la toxine D-sérine<sup>82</sup>, l'inhibition du protéasome<sup>83</sup> ou une carence en acide aminée prolongée comme la leucine<sup>84</sup>.

Ces différentes études mettent en exergue l'importance du rôle de CHOP (ou gadd153) via l'axe eIF2 $\alpha$ /ATF4 dans le déclenchement de l'apoptose. D'une part, CHOP a été repéré comme étant un régulateur négatif de la protéine anti-apoptotique bcl-2<sup>85</sup>. D'autre part, CHOP provoque la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax du cytosol à la mitochondrie<sup>86</sup> et participe à la régulation des facteurs pro-apoptotiques BIM et PUMA<sup>87,88</sup>. Ces facteurs agissent via la voie intrinsèque de l'apoptose en régulant la perméabilité mitochondriale et le relargage de cytochrome C<sup>89</sup>. Dans certaines pathologies ou suite à un traitement, ces processus d'apoptose induits par GCN2 ne sont pas correctement régulés et peuvent être

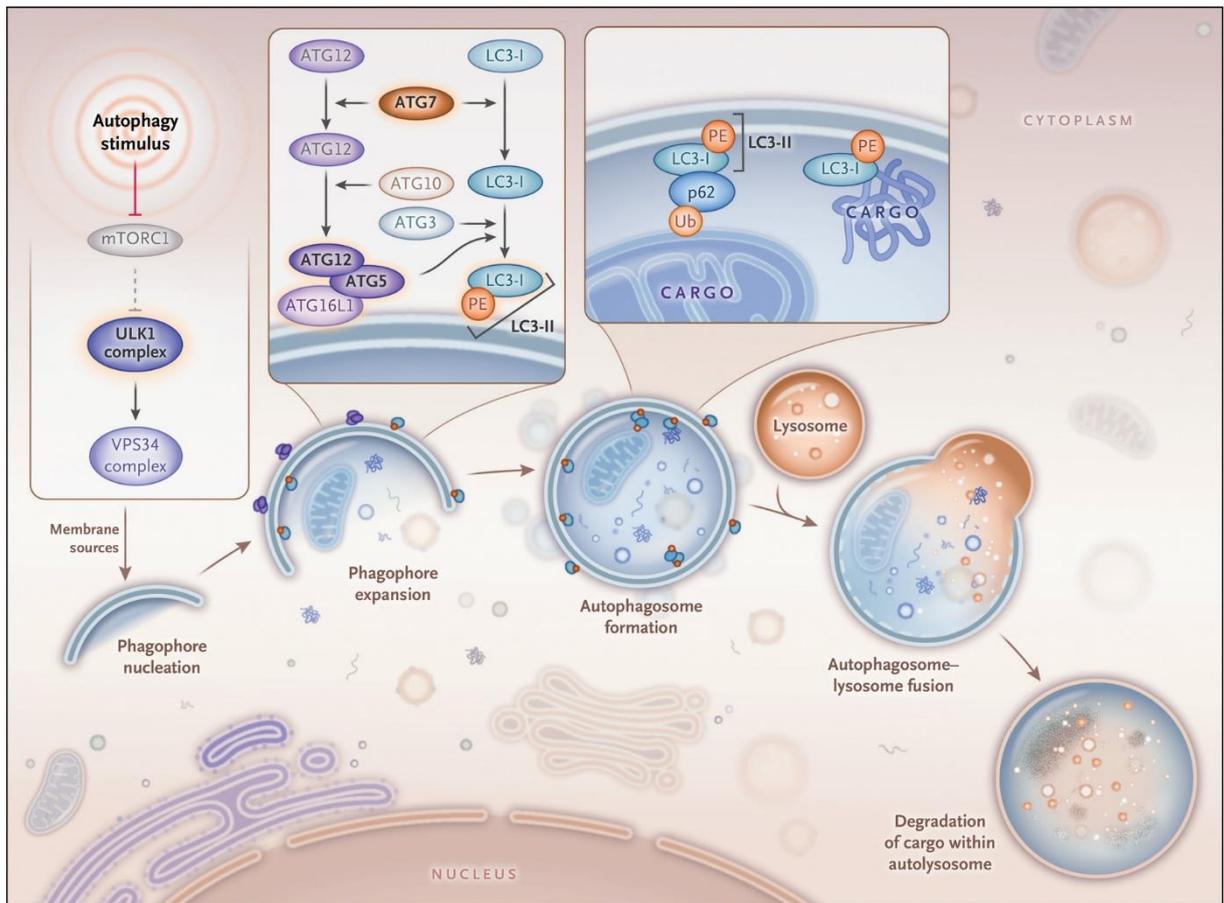
néfastes pour l'organisme. L'équipe de Y. Chuen ont été les premiers à révéler l'effet bénéfique de l'inhibition de GCN2 sur le développement d'une insuffisance cardiaque. La délétion de GCN2 chez les souris ayant subi une constriction transverse aortique, induisant une hypertrophie cardiaque, provoque une atténuation de la dysfonction et de la dilatation ventriculaire. Ces observations sont accompagnées par une augmentation de l'expression de bcl-2 et une diminution des processus d'apoptose dans les cardiomyocytes<sup>90</sup>.

### e) Autophagie

L'autophagie est un processus utilisé par les cellules pour dégrader et recycler du matériel cellulaire. Ce processus se réfère à la dégradation se déroulant à l'intérieur des lysosomes. L'autophagie est ainsi un processus très important pour l'homéostasie et la survie cellulaire.

- Définition

Les composants cellulaires endommagés, dysfonctionnels et/ou potentiellement toxiques pour l'organisme, sont dégradés pour une détoxification, production d'énergie et un renouvellement cellulaire, permettant ainsi un processus de recyclage cellulaire efficace<sup>91</sup>. Trois types d'autophagie ont été décrits dans les cellules de mammifères : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macro-autophagie (processus le plus étudié, communément appelé : autophagie). Ce dernier type est très bien conservé entre les différentes espèces procaryotes et eucaryotes (Figure 12).



**Figure 12 : Mécanisme général de la macro-autophagie.**

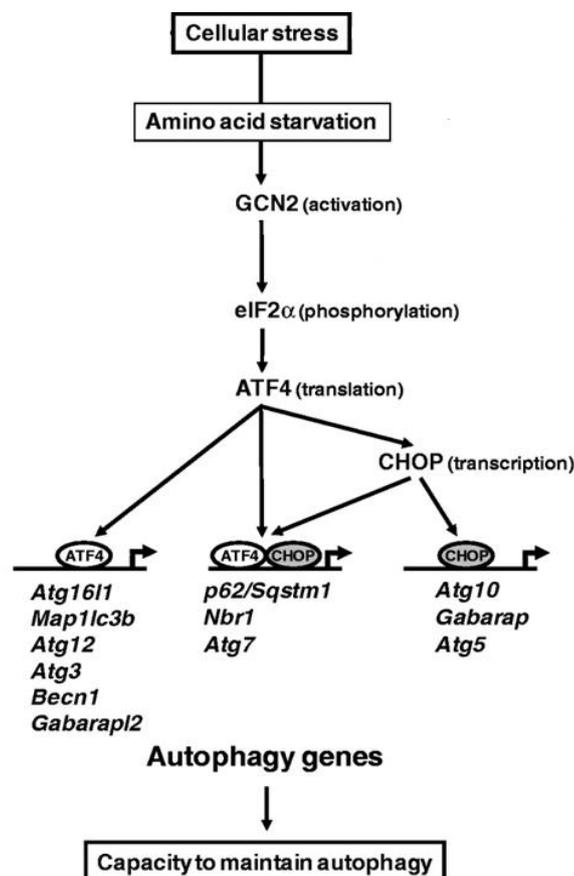
L'autophagie débute avec la formation d'un phagophore à partir de membranes de compartiments cellulaires (étape de nucléation). Le phagophore, grâce aux différentes protéines ATG, s'allonge ensuite pour former un autophagosome (étape d'élongation). L'autophagosome peut séquestrer des organites ou des protéines à recycler. L'autophagosome va finalement fusionner avec un lysosome pour dégrader le matériel séquestré et ainsi le recycler (issue de <sup>92</sup>)

Ce processus cellulaire a été montré comme jouant un rôle important dans la réponse aux différents stress cellulaires. Un des plus connu est la réponse au manque en acides aminés.

- Régulation de l'autophagie lors d'une carence en acides aminés

En 1977, une étude a montré qu'un manque d'acides aminés dans le foie du rat induisait rapidement une augmentation du nombre d'autophagosomes<sup>93</sup>. Ces résultats ont par la suite été confortés lorsqu'une corrélation a été établie entre le manque en acides aminés et l'augmentation de l'expression de p62, un important marqueur de l'autophagie<sup>94</sup>. Face à un manque en acides aminés, la cellule a besoin d'une stratégie efficace pour synthétiser les protéines capables de répondre au stress. Ce processus est l'ISR (décrit dans le paragraphe 1.3.b). Malgré la régulation transcriptomique stricte mise en place par l'ISR, la cellule peut avoir besoin d'un mécanisme de défense supplémentaire lui permettant de générer

rapidement des acides aminés à partir de protéines existantes. Le processus d'autophagie est alors déclenché. Ainsi, lors d'un manque de nutriments entraînant une diminution des acides aminés essentiels, les cellules eucaryotes simultanément, diminuent la synthèse globale de protéines tout en augmentant la dégradation des protéines par la voie de l'autophagie<sup>95</sup>. Une autre étude a mis en évidence l'importance de GCN2 dans la formation, l'élongation et la fonction de l'autophagosome lors du manque d'un acide aminé. Ces études ont permis de différencier trois classes de gènes de l'autophagie en fonction de leur dépendance à ATF4 et/ou CHOP et de leur liaison avec des promoteurs spécifiques<sup>96</sup>.



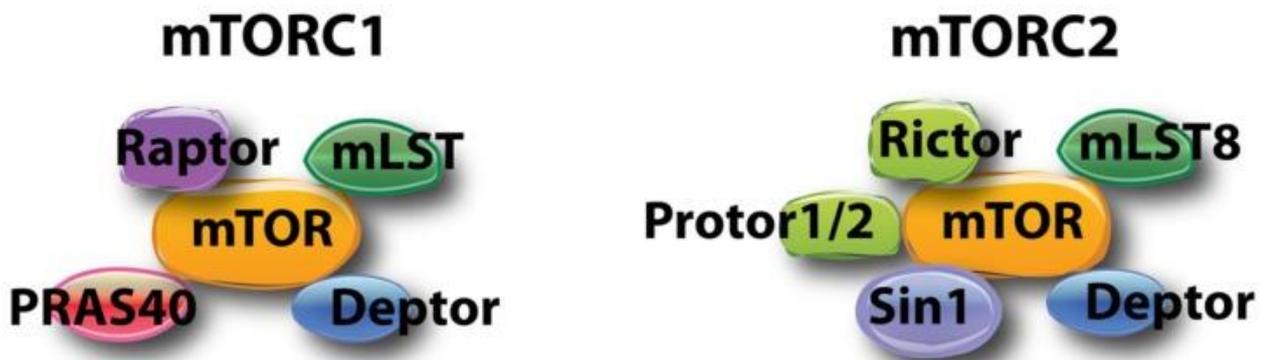
**Figure 13 : Schéma mécanistique de la régulation des gènes de l'autophagie par la voie GCN2/eIF2α/ATF4**  
(adapté de <sup>96</sup>)

Lorsque GCN2 est activée lors de carences en acides aminés, elle va permettre l'induction du facteur de transcription ATF4 via la phosphorylation d'eif2α. Ce dernier est capable de se lier au promoteur de certains gènes grâce aux séquences CARE (voir la partie 1.1.b). C'est notamment le cas des gènes Map1lc3b, Atg12 ou encore Atg3. ATF4 est également capable d'induire l'expression du facteur de transcription CHOP. Ce facteur va permettre d'induire

l'expression de deux autres sets de gènes : des gènes dépendants d'ATF4 et de CHOP (par exemple p62/Sqstm1 et Atg7) ou fixant seulement CHOP (Atg10, Atg5 et Gabarap) (Figure 13). Ce dernier groupe de gènes ne fixant que CHOP, est néanmoins dépendant de l'expression d'ATF4 <sup>96</sup>.

#### f) mTOR : l'inhibiteur de GCN2

La protéine mTOR (mechanistic target of rapamycin) est une enzyme de la famille des sérine/thréonines kinases. En s'associant à d'autres protéines, mTOR forme deux complexes différents : mTORC1 et mTORC2. Ils contiennent la même sous-unité composée de mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) et DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein). Cependant, les protéines Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) et PRAS40 (40 kDa proline-rich Akt substrate) sont spécifiques du complexe mTORC1 tandis que les protéines Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), Protor1/2 et mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase(SAPK)-interacting protein 1) appartiennent au complexe mTORC2 <sup>97 98</sup> (Figure 14).



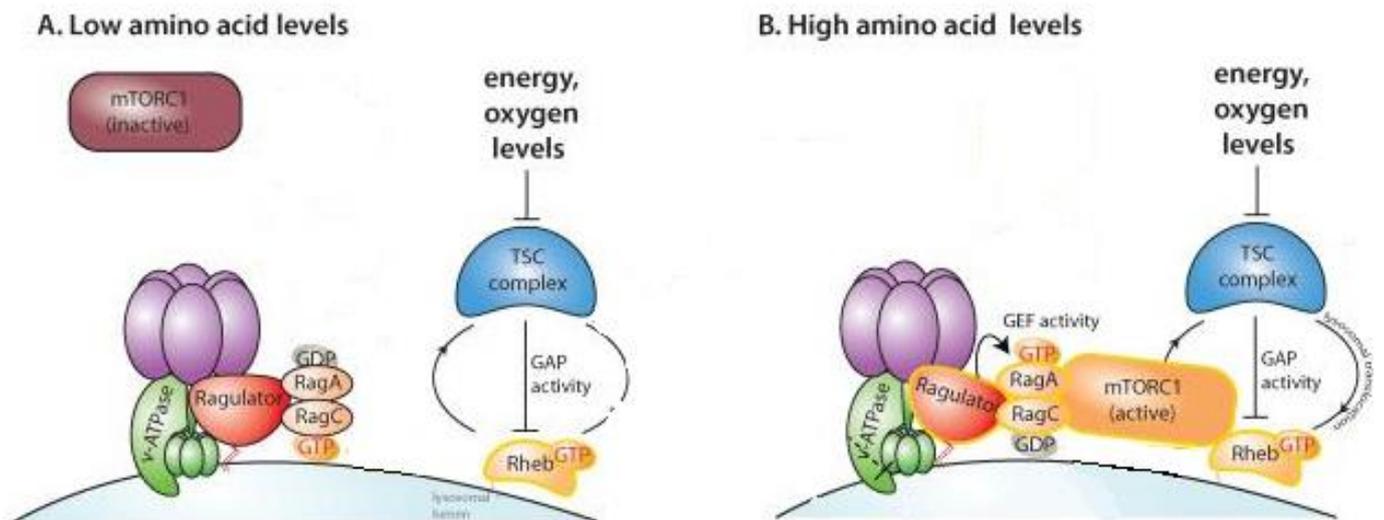
**Figure 14 : Structure schématique des complexes mTORC1 et mTORC2**

Les deux complexes sont composés de mLST8 et Deptor. Dans le complexe 1, mTOR est associé spécifiquement à PRAS 40 et RAPTOR tandis que dans le complexe 2, mTOR s'associe à Rictor, Protor1/2 et Sin 1 (issue de <sup>99</sup>)

Le complexe mTORC1 participe à de nombreux processus liés à la croissance et au métabolisme cellulaire. Il contrôle positivement de nombreux processus anaboliques, comme la traduction des ARNm<sup>100</sup>, tout en réprimant des processus cataboliques comme l'autophagie<sup>101</sup>. mTORC1 est régulé par quatre signaux principaux : les facteurs de croissance, la concentration en oxygène, le statut énergétique et la disponibilité en acides aminés<sup>102</sup>.

- Activation de la voie mTORC1 par les acides aminés

Il a été démontré que les acides aminés (particulièrement l'arginine, la leucine et la glutamine) activent le complexe mTORC1<sup>103</sup>. Cette activation est régulée par les protéines GTPases nommés RAGs. Chez les mammifères, on retrouve quatre membres qui s'associent deux à deux : RAG A-RAG B et RAG C-RAG D. Les RAGs sont situées au niveau du lysosome<sup>104</sup>. En présence d'acides aminés, RagA/B sont liées au GTP et RagC/D sont liées au GDP. Ces complexes permettent, via leur liaison directe à RAPTOR, la relocalisation de mTORC1 au lysosome à proximité de la protéine activatrice de mTORC1 : Rheb (Ras homolog enriched in brain)<sup>105</sup>. Lorsque les cellules sont privées en acides aminés, inversement, RAG A/B sont liées au GDP et RAG C/D sont liées au GTP. Ainsi ils recrutent TSC2 qui inhibe la protéine RHEB et la signalisation mTORC1. mTORC1 est alors localisé de façon diffuse dans le cytoplasme à proximité de la protéine activatrice Rheb (Figure 15)<sup>106</sup>.



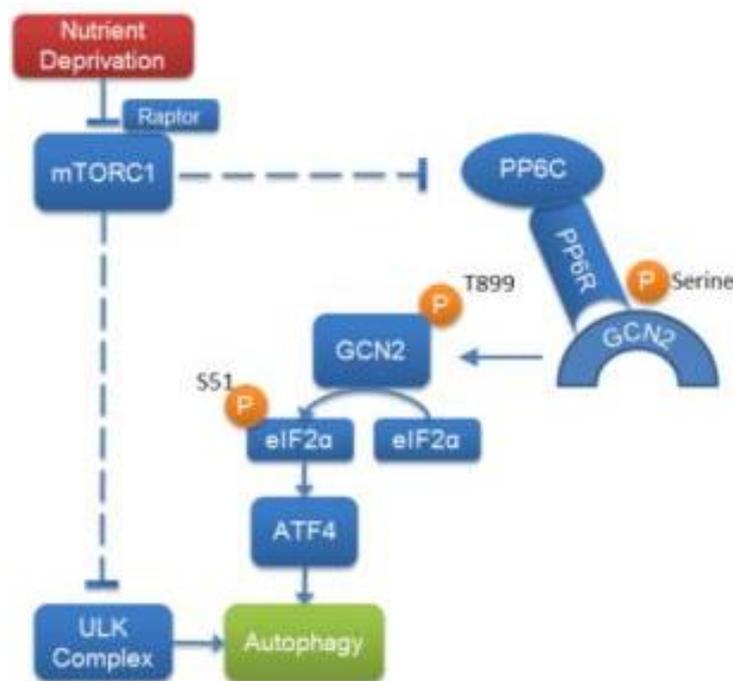
**Figure 15 : Mécanismes de la voie mTORC1 régulée par les acides aminés**

A : Lors d'une carence en acides aminés, mTORC1 est sous forme inactive localisée de manière diffuse dans le cytoplasme. Les protéines RagA et RagC sont respectivement couplées aux molécules de GDP et GTP. B : Sous une stimulation d'acides aminés, l'hétérodimère RagA-GTP/RagC-GDP est actif et permet la relocalisation de mTORC1 sur la surface du lysosome ou celui-ci interagit avec sa protéine activatrice Rheb. Le complexe Ragulator est indispensable pour l'activation des RAG-GTPases. Il permet d'une part, le maintien des RAGS sur le lysosome et d'autre part, leur activation via son activité GEF (guanine nucleotide exchange factors) permettant la dissociation du GDP et la formation du GTP (issue de<sup>107</sup>)

- Interactions entre les voies GCN2 et mTOR

Les voies GCN2 et mTOR sont deux voies importantes impliquées dans la régulation du métabolisme cellulaire. La première est activée lors d'un déficit en acides aminés tandis que la deuxième est initiée lors d'un apport d'acides aminés. Au vu de leurs conditions d'initiations opposées, la question est de savoir comment leurs activations peuvent être coordonnées dans la cellule. Plusieurs études ont montré l'interaction entre ces deux voies détectrices d'acides aminés <sup>108,109</sup>.

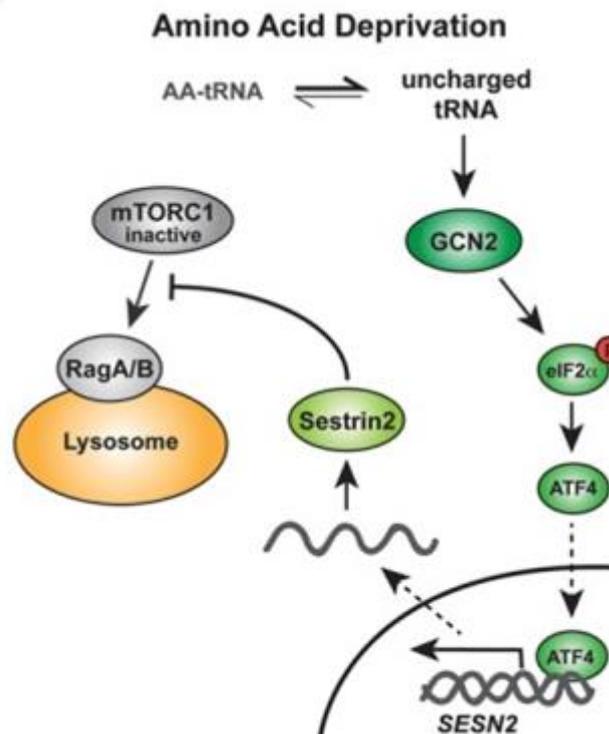
Une première étude montre que l'inhibition de mTORC1 par le manque en acides aminés semble entraîner l'activation de GCN2. Dans la levure, lorsque mTORC1 est inhibé, SIT4 est libre de déphosphoryler la sérine 577 de la kinase GCN2, permettant ainsi une plus grande affinité entre GCN2 et les ARNt désacétylés. Cette liaison induit l'activation de GCN2. L'activation de GCN2 par SIT4 est donc dépendante de l'inhibition de la voie mTORC1<sup>110</sup>. Ces résultats ont été retrouvés chez la souris. La protéine orthologue à SIT4 chez le mammifère est la protéine PP6C (Figure 16). PP6C pourrait ainsi être un substrat de GCN2, différent de eif2 $\alpha$  et MRS<sup>111</sup>.



**Figure 16 : Schéma du mécanisme d'inhibition de la voie mTORC1 lors d'une carence en acides aminés menant à l'activation de GCN2 dans la levure**  
 Lors d'une carence en acides aminés, l'inhibition de mTORC1 induit l'activation de PP6C. PP6C s'associe avec GCN2 et provoque son activation. La protéine GCN2, activée, phosphoryle eif2 $\alpha$  induisant ainsi un processus d'autophagie. (issue de <sup>111</sup>)

Avec ce modèle d'activation, il est tentant de supposer que mTORC1 inhibe GCN2 en présence d'acides aminés. Cependant, chez les mammifères, les sites de phosphorylation de GCN2

impliqués dans l'activation de GCN2 par PP6C ne sont pas encore connus. Des études proposent une autre hypothèse sur l'interaction entre GCN2 et mTORC1 : l'activation de GCN2, par le manque en acides aminés, conduit à l'inhibition de l'activité de mTORC1. Il semblerait que la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et l'augmentation de traduction d'ATF4 soit essentielles à l'inhibition de mTORC1 lors d'un déficit en acides aminés<sup>112 113</sup>. En effet, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  par GCN2 conduit à l'augmentation de traduction d'ATF4. Celui-ci cible la transcription de certains gènes capables de répondre au stress métabolique (ce mécanisme est décrit dans la partie 1.2.b de ce chapitre). L'un de ces gènes est *Sesn2*, codant pour la protéine Sestrin2. Sestrin2 participe à l'inhibition du recrutement du complexe mTORC1 à la surface lysosomale. GCN2 est ainsi capable d'inhiber l'activité de mTORC1 lors d'un déficit d'acides aminés via l'augmentation de transcription de Sestrin2 (Figure 17)<sup>114</sup>.



**Figure 17 : Schéma du mécanisme d'inhibition de mTORC1 par activation de GCN2 lors d'une carence en acides aminés**

Lors d'un déficit en acides aminés, l'accumulation d'ARNt désacétylés active la voie GCN2/eIF2 $\alpha$ -p/ATF4 induisant l'expression de Sestrin 2. Celle-ci inhibe la relocalisation de mTORC1 sur la membrane lysosomale. (adaptée de <sup>114</sup>)

Tout comme GCN2, la voie mTOR possède ainsi un rôle primordial dans le maintien du métabolisme cellulaire. mTORC1 favorise la division et la prolifération cellulaire en fonction de la disponibilité en nutriment. Or il a été montré que le manque de certains acides aminés

influe sur le système immunitaire. Il n'est donc pas surprenant d'observer l'influence de GCN2 dans la réponse immunitaire.

## 1.4. La réponse de GCN2 à un stress inflammatoire

### a) Le système immunitaire

La réaction immunitaire est basée sur la capacité de détection par l'organisme d'éléments pathogènes. Cette détection nécessite une étape de reconnaissance qui est assurée par une série de récepteurs solubles ou liés à des cellules. La première étape dans la réaction immunitaire est donc la reconnaissance de ces agents pathogènes afin d'éliminer les microbes pathologiques ainsi que les cellules toxiques et/ou les allergènes tout en évitant d'endommager les tissus. L'efficacité de cette reconnaissance est liée à son pouvoir discriminant<sup>115</sup>. Cette phase de reconnaissance terminée, une réaction immunitaire adaptée est enclenchée. Les mécanismes activés peuvent être divisés en deux catégories : la réponse immunitaire innée immédiate, non-spécifique et la réponse immunitaire adaptative, plus tardive mais spécifique.

- Le système immunitaire inné

Particulièrement bien défini, le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Cette réaction est immédiate et se déclenche directement après l'étape de reconnaissance. Elle s'appuie sur des cellules immunitaires capables de détruire les agents infectieux de manière non spécifique. Le système immunitaire inné inclut des barrières physiques, comme :

- La peau qui permet une protection mécanique contre la perte d'eau et l'infiltration des agents pathogènes,
- Les cellules épithéliales, recouvertes de muqueuse présentes dans le système respiratoire, gastro-intestinal et génito-urinaire <sup>116</sup>.

Cependant des agents infectieux peuvent échapper aux mécanismes mis en jeu au niveau cutanéomuqueux et pénétrer dans l'organisme. Les cellules de la réponse immunitaire innée vont alors déclencher la réponse inflammatoire détaillée dans la partie 1.4.c. Les cellules de l'immunité innée sont majoritairement d'origine myéloïde incluant des granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles) et des phagocytes (monocytes, macrophages, et cellules dendritiques). Des cellules d'origine lymphoïde comme les cellules Natural Killer (NK) opèrent aussi dans la réponse immunitaire innée (Figure 18).

La réponse innée a aussi un rôle dans le déclenchement des réponses adaptatives. Lors du déclenchement de la réponse inflammatoire, les cellules présentatrices d'antigènes (essentiellement les cellules dendritiques) sont capables de collecter les protéines antigéniques de l'agresseur et de les présenter à leurs surfaces. Ces cellules jouent alors un rôle de messenger en migrant jusqu'à la zone T-dépendante des organes lymphoïdes secondaires. Les cellules dendritiques peuvent ainsi présenter les antigènes aux lymphocytes T et ainsi déclencher la réaction immunitaire adaptative<sup>117</sup>.

- Le système immunitaire adaptatif

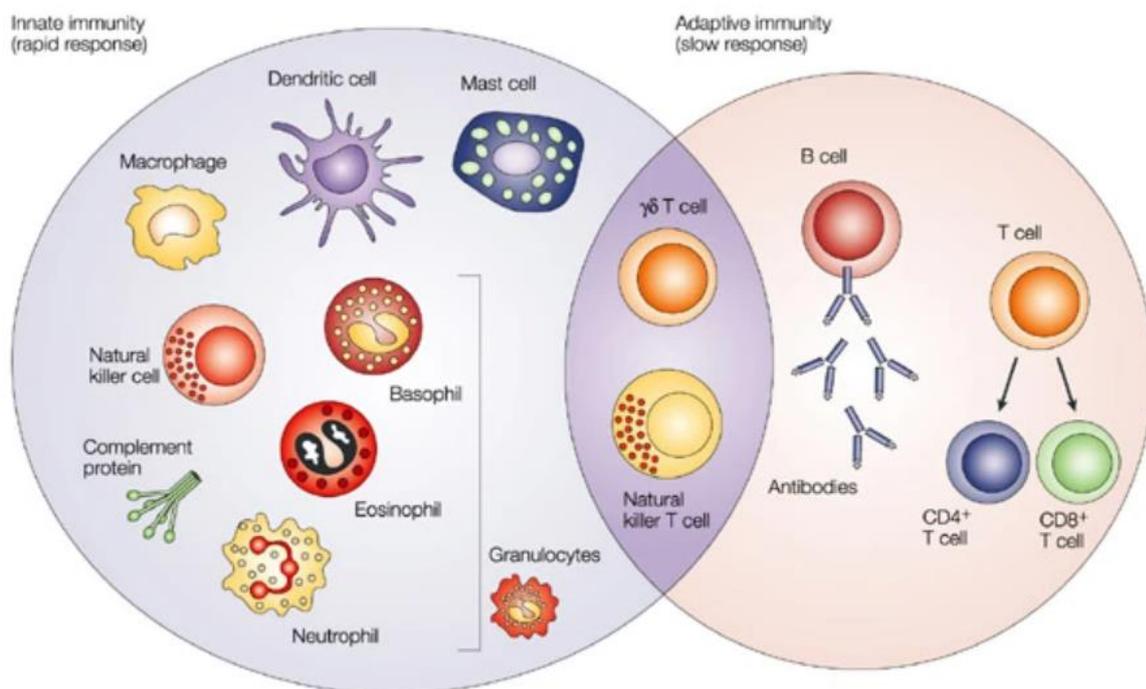
Lorsque la réponse immunitaire innée n'est pas suffisante pour l'élimination de l'agent pathogène, la réaction immunitaire adaptative prend le relais. Les fonctions principales de la réponse adaptative sont : la reconnaissance spécifique des antigènes du « non soi » ; la production d'effecteurs immunologiques spécifiques du pathogène identifié ; l'élimination de l'agent pathogène et la mise en place d'une immunité mémoire permettant d'éliminer plus rapidement et efficacement l'agent pathogène en cas de nouvelle infection. Les cellules de la réponse immunitaire adaptative incluent les lymphocytes T et les lymphocytes B<sup>118</sup>.

Les lymphocytes T possèdent des immunorécepteurs de types TCR (*T cell receptor*). Ceux-ci reconnaissent les antigènes sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La reconnaissance de l'antigène induit l'activation des lymphocytes T. Les lymphocytes T activés peuvent être divisés en deux populations : les lymphocytes T helpers (LTh) exprimant la molécule CD4 et les lymphocytes T cytotoxiques exprimant la molécule CD8 (LTC). Les LTh peuvent se différencier en plusieurs sous types, eux-mêmes définis par leur production de cytokine. Les principaux LTh sont les cellules Th1, producteurs de l'interféron gamma, les Th2 producteurs de l'interleukine 4 (IL4), IL5 et IL13 et les Th17 producteurs de l'IL17, IL22 et IL21. Les LTC cytotoxiques sont capables d'éliminer les cellules présentant des antigènes étrangers ou des antigènes du soi anormaux en déclenchant la cascade d'activation des caspases et le programme de mort par apoptose<sup>119</sup>

Dans le cas des agents infectieux extracellulaires, la réponse adaptative est à médiation humorale. L'identification de l'antigène agresseur est opérée par les lymphocytes B. Ces lymphocytes reconnaissent les épitopes de l'agent pathogène dans leur forme native grâce à leurs immunorécepteurs de type BCR (*B cell receptor*). Les lymphocytes B se différencient en

plasmocytes et sont capables de produire des anticorps circulants spécifiques de l'antigène. Ceux-ci neutralisent l'agent pathogène permettant aux macrophages de les éliminer par phagocytose<sup>120</sup>.

Au décours des réponses immunitaires, les lymphocytes B comme les lymphocytes T donnent naissance à des cellules mémoires à durée de vie longue dont le rôle est de répondre plus efficacement et plus rapidement à une nouvelle exposition à un antigène donné<sup>121</sup>.



Nature Reviews | Cancer

**Figure 18 : Les cellules impliquées dans la réponse immunitaire**

Dans le cercle violet, les cellules appartiennent à la réponse immunitaire innée tandis que dans le cercle orange les cellules présentées sont les cellules de la réponse immunitaire adaptative. Deux types cellulaires sont communs aux deux réponses : les  $\gamma\delta$  T cells et les Natural killer T cells (issue de <sup>122</sup>)

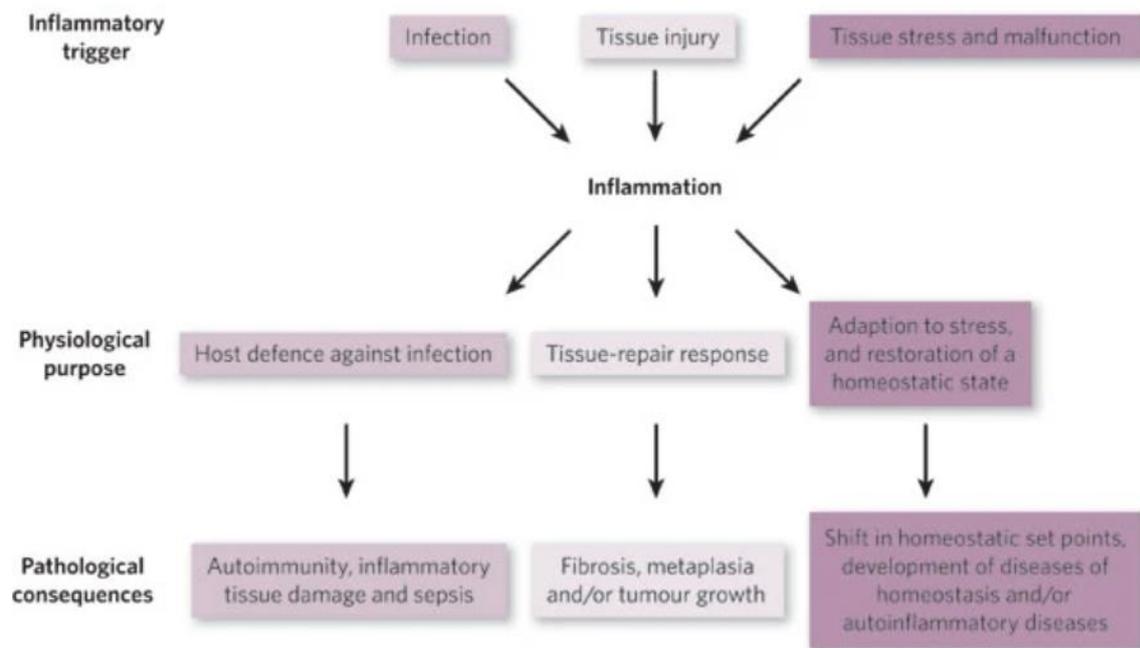
Les systèmes immunitaires, inné et adaptatif, sont souvent décrits comme deux catégories distinctes de la réponse immunitaire ; cependant, ils agissent généralement en cohésion l'un avec l'autre. Ainsi, malgré leurs différences fondamentales dans leurs modes d'action, la synergie entre la réponse immunitaire, innée et adaptative, est essentielle pour une réponse immunitaire efficace et complète<sup>123</sup>.

## b) La réponse inflammatoire

L'inflammation est déclenchée par le système immunitaire suite à un stimulus nocif pour l'organisme. Son activation permet de déclencher l'étape de guérison. L'inflammation est ainsi un mécanisme de défense vital pour l'organisme. Différentes causes biologiques peuvent déclencher l'inflammation : une infection, une blessure ou un dysfonctionnement tissulaire. Durant une réponse inflammatoire aiguë, des interactions entre des éléments cellulaires et moléculaires contribuent à l'élimination de l'agent infection et/ou à la restauration de l'homéostasie tissulaire. Cependant, une inflammation non contrôlée conduit au développement d'un état inflammatoire chronique. Les causes et les mécanismes de l'inflammation chronique dans le cas d'une infection, d'une maladie auto-immune ou d'une inflammation systémique chronique (comme dans le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires) ne sont pas totalement clairs et moins détaillés que dans le cas de l'inflammation aiguë.

Au niveau tissulaire, l'inflammation est caractérisée par des rougeurs, gonflements, douleurs et la perte de fonction tissulaire. La réponse inflammatoire peut être déclenchée suite à une agression d'origine exogène. La cause de cette agression peut être infectieuse ou non infectieuse (allergie, composant toxique, corps étrangers...). Lors d'une infection, la réponse inflammatoire est déclenchée par des structures moléculaires caractéristiques des micro-organismes pathogènes connus sous le nom de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)<sup>124</sup>. Cependant, les agents pathogènes externes à l'organisme ne sont pas les seules causes de lésions tissulaires et cellulaires. En effet, la réponse inflammatoire peut aussi être déclenchée par une agression d'origine endogène. Celle-ci diffère de l'agression exogène par ses motifs moléculaires associés aux dégâts, connus sous le nom de DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern*). Lors d'un stress, d'une lésion ou d'un dysfonctionnement tissulaire, les cellules en apoptose ou en nécrose secrètent ou exposent à leur surface les DAMPs fonctionnant comme adjuvant ou comme un signal de danger pour le système immunitaire inné<sup>125</sup>. Ils peuvent être sécrétés ou relâchés, comme l'ATP, HMGB1 (*high mobility group protein B1*) ou la calprotectine (connue aussi sous le nom de complexe S100A8/S100A9). D'autres DAMPs sont exposés *de novo* ou sont enrichis à la surface de la membrane, comme la calreticuline (CRT) et la protéine heat shock 90 (HSP90)<sup>126</sup>. La reconnaissance de ces PAMPs et DAMPs est la première étape de la réaction inflammatoire.

Les mécanismes de l'inflammation dépendent ainsi de la nature du stimulus et de sa localisation dans l'organisme. Chaque stimulus aura des conséquences physiologiques et pathologiques différentes <sup>127</sup> (Figure 19 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).



**Figure 19 : Les causes et conséquences physiologiques et pathologiques de l'inflammation** (issue de <sup>127</sup>)

Cependant, ces différents types d'inflammation partagent le même schéma réactionnel.

- Initiation de la réaction inflammatoire

Les PAMPs et les DAMPs sont reconnus par les mêmes récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires appelé les PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*). Il existe des PRRs membranaires (membrane plasmique et endosomale) comme les Toll-like receptors (TLRs) ou des PRRs cytoplasmiques comme les NOD-like Receptors (NLRs)<sup>128</sup>. Avec plus de dix récepteurs différents identifiés, les TLRs représentent une des familles des PRRs les plus étudiées.

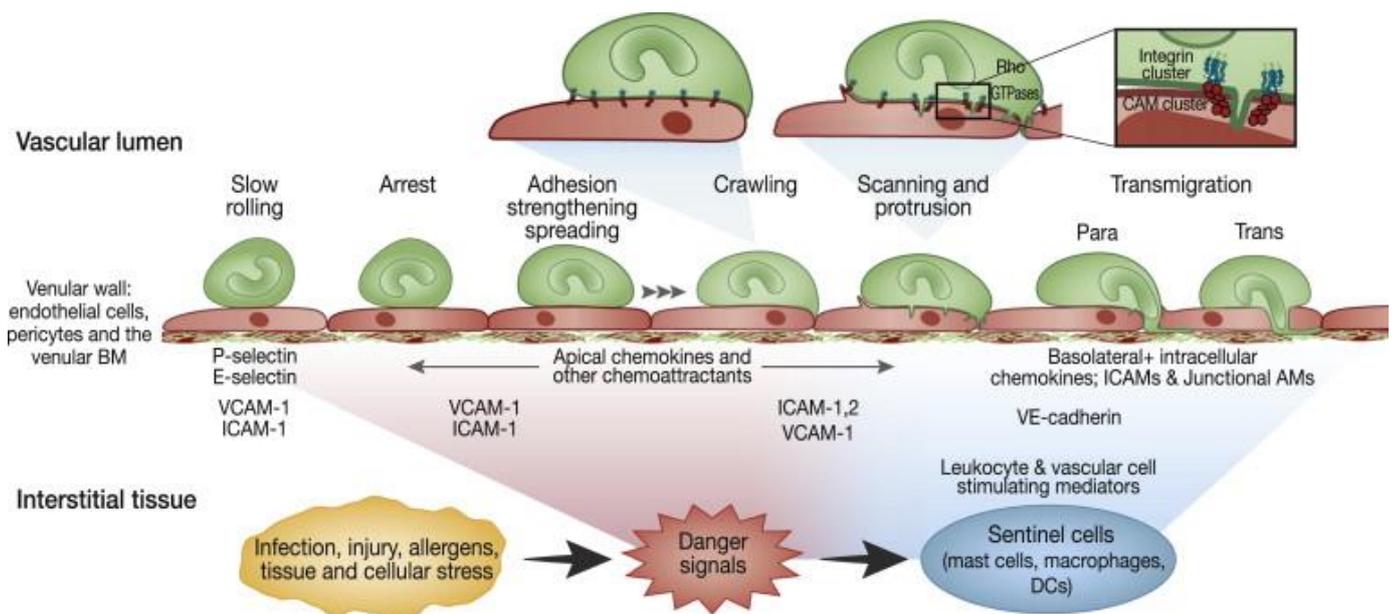
Certains TLRs sont connus pour reconnaître des motifs spécifiques. Par exemple, TLR4 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatives, TLR2 reconnaît les peptidoglycans des bactéries à Gram positives et TLR7 reconnaît les ARN viraux. Ils sont exprimés différenciellement parmi les cellules immunitaires.

Lors de l'étape d'initiation, les signaux dangers (DAMPs et PAMPs) sont essentiellement reconnus par les cellules résidentes des tissus comme les macrophages et les mastocytes, via leurs PRRs<sup>129</sup>. Ces cellules vont sécréter des médiateurs inflammatoires tels que les cytokines (IL6, IL1 $\beta$  ou TNF- $\alpha$ ), les amines vasoactives (comme l'histamine), les chimiokines (comme IL8 ou CCL2), les eicosanoïdes (comme leucotriène A4) et les peptidases (comme les métalloprotéases)<sup>130-134</sup>. Ces médiateurs induisent l'activation de l'endothélium qui va exprimer des molécules d'adhérence tout en augmentant la perméabilité vasculaire et provoquer une vasodilatation des vaisseaux. Ce processus permet le recrutement des cellules immunitaires circulantes.

- Recrutement des phagocytes

Les cellules circulantes adhèrent aux cellules endothéliales des vaisseaux, franchissent la paroi vasculaire par diapédèse pour atteindre le site de l'agression exogène ou endogène (Figure 20). Les premières cellules recrutées vers le site infectieux ou inflammatoire sont les polynucléaires neutrophiles qui seront rapidement suivis par les monocytes.

Ces cellules migrent par chimiotactisme (migration orientée dans le sens d'un gradient de concentration de molécules chimioattractantes émises par l'agent pathogène ou induites par celui-ci). La diapédèse est possible grâce aux molécules d'adhérence exprimées par les cellules circulantes (comme la L-selectine à la surface des neutrophiles) et par les cellules endothéliales (comme la E- et P selectine). Cette adhésion induit un ralentissement du flux des neutrophiles et initie la phase de roulement à la surface de l'endothélium tout en activant les intégrines de surface des neutrophiles. Les intégrines se lient aux molécules d'adhérence ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecules) de l'endothélium et provoquent l'immobilisation des leucocytes, leurs permettant alors de franchir la paroi vasculaire vers le site inflammatoire<sup>135</sup>.



**Figure 20 : Processus de recrutement des cellules circulantes lors d'une inflammation**

En réponse à différents stimuli inflammatoires, des signaux « danger » et des médiateurs inflammatoires, relâchés par les cellules immunitaires, stimulent les cellules vasculaires et les leucocytes. Ce recrutement est initié par une adhésion des leucocytes à l'endothélium, suivi par un ralentissement de leur mobilité. Pour franchir la paroi vasculaire, les leucocytes enchainent les phases de roulement, de fixation et d'adhésion et sont guidés par les molécules d'adhésion de l'endothélium, les selectines de l'endothélium et des leucocytes et les intégrines (issue de <sup>136</sup>)

- L'élimination de l'agent pathogène

Sur le site de l'inflammation, les neutrophiles et les monocytes reconnaissent les PAMPs ou les DAMPs grâce à leurs PRRs. Cette adhésion déclenche la phagocytose permettant la destruction de l'agent pathogène. Lorsque la taille de l'agent pathogène ne permet pas la phagocytose, d'autres mécanismes sont mis en place. Les neutrophiles sont capables d'une part de déclencher les mécanismes de dégranulation permettant le déversement rapide de

substances bactéricides, d'autre part de former des NET (Neutrophil Extracellular Traps) par nétose correspondant à la libération de filaments d'ADN issus du noyau ou des mitochondries, recouverts de nombreux composants microbicides. Enfin, les monocytes et les neutrophiles peuvent aussi induire la production de ROS (*reactive oxygen species*) capable d'altérer la structure des protéines, des lipides et des acides nucléiques, participant ainsi à la destruction des agents pathogènes<sup>137–139</sup>.

- La réparation tissulaire et la régulation de la réponse inflammatoire

Après élimination de l'agent pathogène, la réponse inflammatoire s'autorégule afin de réduire les dommages tissulaires. Les neutrophiles entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages entraînant alors un changement dans leur polarisation. Ils passent d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) à un phénotype anti-inflammatoire (M2). Grâce à la production de molécules anti-inflammatoires comme l'IL10 et le TGF- $\beta$  par les macrophages M2, les mécanismes de réparation tissulaire sont enclenchés. Si cette dernière étape échoue, la réponse adaptative (détaillé dans la partie 1.4a) est alors déclenchée.

### c) GCN2, un régulateur de la réponse inflammatoire

Le métabolisme et les fonctions immunitaires sont étroitement liés. Cette interaction est au centre des mécanismes homéostatiques. Un dysfonctionnement d'un de ces processus peut conduire à un ensemble de complications métaboliques et inflammatoires chroniques. Les différentes étapes de l'inflammation, recrutement cellulaire, activation des cellules immunitaires, phagocytose et réparation tissulaire, requièrent une importante quantité d'énergie et de nutriments, en particulier les acides aminés<sup>140</sup>. La protéine GCN2, étant le principal détecteur d'une carence en acide aminé, elle détient un rôle déterminant dans chaque étape de la réponse inflammatoire.

- L'inflammation et les acides aminés

Durant une réponse immunitaire, une redistribution des acides aminés vers les tissus impliqués dans l'inflammation est observée pour favoriser la synthèse des protéines immunitaires<sup>141</sup>.

L'initiation des processus inflammatoires, suite à une infection bactérienne ou virale (agression exogène) ou une inflammation stérile (agression endogène) induit alors une

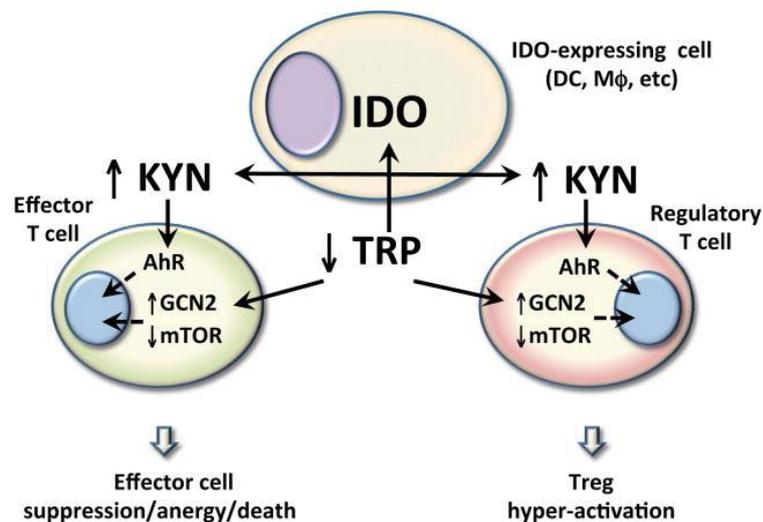
carence en acide aminé et active GCN2<sup>142,143</sup>. En effet, les cellules immunitaires sont auxotrophes pour les acides aminés.

Le catabolisme de certains acides aminés régule les fonctions et la survie des cellules immunitaires. C'est le cas de la glutamine, de l'arginine et du tryptophane. Lors d'une stimulation au LPS (stress inflammatoire), une quantité minimum de glutamine (0,03mmol/L) est requise pour l'induction de l'IL-1 $\beta$  par les macrophages<sup>144</sup>. De plus les macrophages utilisent l'arginine pour la production d'oxyde nitrique, production indispensable pour leur activité cytotoxique et cytostatique contre les agents pathogènes<sup>145</sup>. Les lymphocytes T et B sont aussi régulés par le métabolisme de la glutamine et de l'arginine. En effet, ces populations cellulaires nécessitent ces acides aminés pour l'activation de leur récepteur antigénique ainsi que pour leurs proliférations et leurs différenciations<sup>146,147</sup>. Enfin, comme l'arginine et la glutamine, la consommation de tryptophane contribue à la réponse immunitaire. Le catabolisme du tryptophane empêche la croissance de bactéries ou de pathogènes parasites présents dans une cellule hôte en les privant de substrat essentiel<sup>148</sup>. L'indoleamine-2,3-dioxygénase 1 (IDO1) permet la dégradation du tryptophane par la voie de la kynurénine. La carence en tryptophane, induite par l'activation de l'enzyme, est détectée par GCN2. La voie IDO1-GCN2 possède ainsi un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire.

- L'importance de l'axe IDO1-GCN2

L'enzyme IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygénase) possède un rôle immuno-régulateur en contrôlant l'inflammation et la tolérance des lymphocytes T<sup>149</sup>. En réponse à un stress inflammatoire induit par la liaison entre le LPS et les TLR4, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) induisent IDO1. D'une part, GCN2 permet au lymphocyte T de détecter l'activation d'IDO1 dans les CPA et, par l'activation de l'ISR, d'arrêter leurs cycles cellulaires. Cependant le rôle précis de GCN2 dans la prolifération des lymphocytes T reste encore à

élucider. Deux études se contredisent sur le sujet. D'une part, l'équipe de Munn a démontré que les cellules T CD8<sup>+</sup> déficientes en GCN2 étaient incapables d'initier l'arrêt de leur cycle cellulaire et proliféraient même lors d'une carence en tryptophane<sup>150</sup>. D'autre part, l'équipe de Van de Velde réfute ces résultats en affirmant que GCN2 n'est pas indispensable aux lymphocytes T pour arrêter leurs cycles cellulaires, en condition de manque en acide aminé ou non<sup>151</sup>. Cependant, les deux études s'accordent sur le fait que GCN2 est nécessaire à l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'activation de l'axe IDO1-GCN2 empêche leur différenciation en lymphocytes T effectrice (Teff) mais favorise leur différenciation en lymphocyte T régulatrice (Treg)<sup>152,153</sup>. Ainsi l'activation de GCN2 semble favoriser la différenciation des CD4<sup>+</sup> en Treg plutôt qu'en Teff tout en altérant l'activité des CD8<sup>+</sup> cytotoxique (Figure 21).



**Figure 21 : Contrôle métabolique des lymphocytes T via l'activation d'IDO1 chez les CPA**

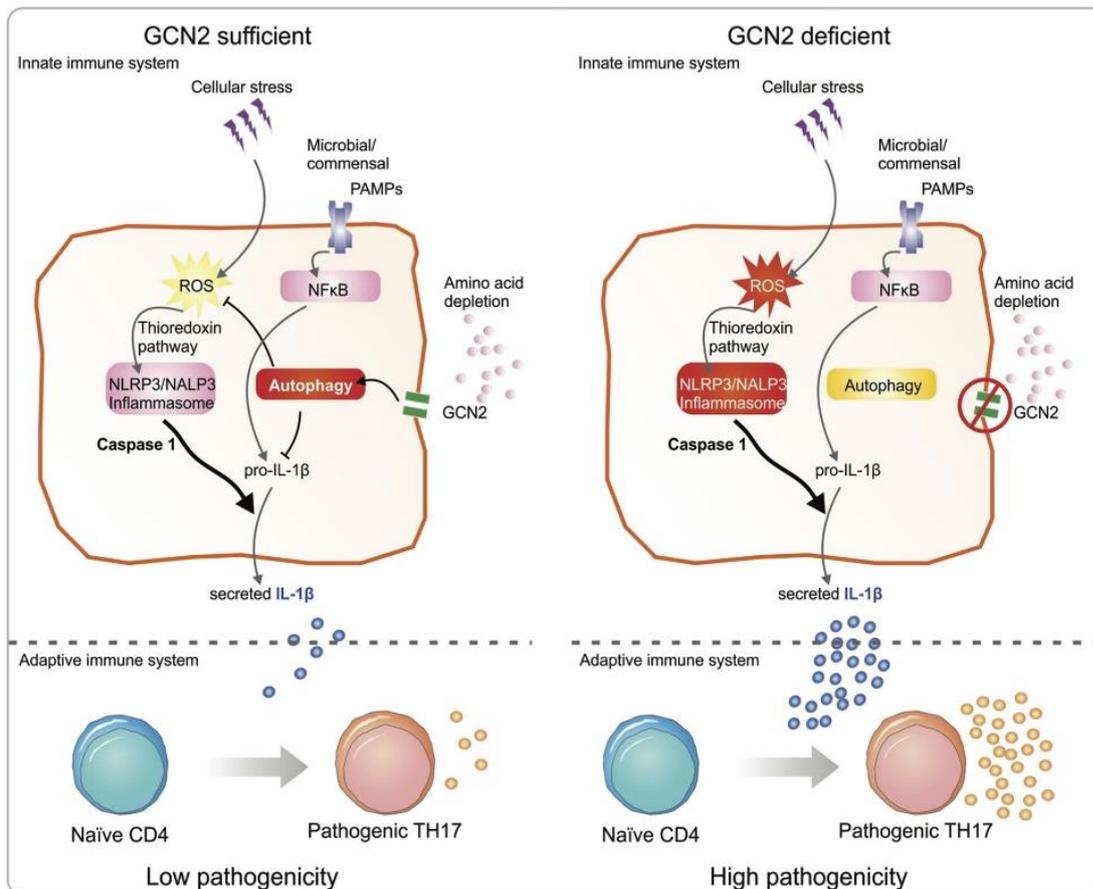
L'activation d'IDO chez les CPA induit une dégradation de tryptophane. Cette carence en acides aminés est détectée par les lymphocytes T via GCN2. L'activation de GCN2 induit la différenciation des lymphocytes T en Treg et bloque la prolifération des Teff (issue de <sup>154</sup>)

D'autre part, cette production d'IDO1 déclenche la consommation de tryptophane dans les CPA, ce qui semble être le mécanisme permettant aux lymphocytes T d'activer GCN2. Similaire à la consommation de tryptophane par IDO1, la dégradation d'arginine par l'arginase dans les macrophages est aussi capable d'activer GCN2 et ainsi reproduire une action inhibitrice du cycle cellulaire des lymphocytes T<sup>155</sup>. La réponse de GCN2, suite à la consommation d'acide aminé dans les CPA, est moins explicite. Une étude montre que dans des conditions de manque en acides aminés, les macrophages soumis au stimulus inflammatoire LPS utilisent

l'axe IDO1-GCN2 pour la production de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-6<sup>156</sup>. En revanche, dans le cas d'un stress inflammatoire déclenché par des cellules en apoptose, et dans des conditions de carence en tryptophane, l'axe IDO1-GCN2 induit la production de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) tout en diminuant la production d'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) via l'activation de l'ISR dans les macrophages<sup>157</sup>. Ainsi, dans le cas d'un stress inflammatoire déclenché par les cellules en apoptose, l'activation de GCN2 joue un rôle protecteur en induisant la tolérance immunitaire et en limitant l'auto-immunité.

- Induction de l'autophagie pour protéger l'organisme du stress inflammatoire

Ce rôle protecteur de GCN2 est aussi retrouvé dans les travaux de Ravindran où le stimulus d'origine est lié à l'autophagie. Ces travaux ont tout d'abord montré que le vaccin contre la fièvre jaune (YF-17D) induit l'activation de GCN2 dans les cellules dendritiques. Cette activation induit une augmentation de l'autophagie dans ces cellules et accroît la présentation antigénique aux cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup><sup>158</sup>. Pour explorer les mécanismes mis en place dans les CPA, les auteurs ont étudié un modèle de souris exposées à un stress inflammatoire intestinal déclenchant les symptômes d'une colite. Après ingestion de DSS (dextran sodium sulfate), les CPA déficientes en GCN2 présentent une production de ROS (dérivé réactif de l'oxygène) et l'activation de l'inflammasome entraînant une augmentation de l'inflammation et de la réponse cellulaire des Th17 (une voie de différenciation des CD4<sup>+</sup>). Ces différentes activations sont marquées par une diminution significative des marqueurs de l'autophagie (Figure 22)<sup>159</sup>. Une autre étude *in vitro* sur les macrophages<sup>160</sup> vient confirmer le rôle protecteur de GCN2 contre le stress inflammatoire via un mécanisme dépendant de l'autophagie.



**Figure 22 : Mécanisme protecteur de GCN2 lors d'une inflammation intestinale**

Le manque en acides aminés induit par le stress inflammatoire, active GCN2, déclenchant ainsi l'autophagie qui va inhiber le stress oxydant et la production de la protéine IL-1 $\beta$  (issue de <sup>159</sup>)

En fonction du stress inflammatoire initial et de la voie de signalisation déclenchée par l'activation de GCN2, les réponses physiologiques diffèrent. Pour autant, son rôle protecteur dans tel organe ou telle pathologie lors d'un stress inflammatoire est unanime.

## 2. La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP)

---

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une forme rare d'hypertension pulmonaire. Cette maladie est caractérisée par des lésions de remodelage, prédominantes sur les capillaires et veinules. Les patients qui en souffrent décèdent d'une défaillance cardiaque droite. Le pronostic des patients atteints d'une MVOP est très défavorable, une étude évalue 70% de mortalité dans la première année suivant le déclenchement de la maladie. Aujourd'hui, la transplantation pulmonaire est le seul traitement possible pour les patients. Ainsi, l'exploration des mécanismes physiopathologiques de cette maladie est primordiale pour y remédier.

### 2.1. Définition générale de la MVOP

#### a) Définition

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP), appelée aussi hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP), est une forme rare d'hypertension pulmonaire. En 1943, Hora et coll ont été les premiers à décrire les symptômes pathologiques de la maladie en constatant une dyspnée progressive, une cyanose, une occlusion des petites veines pulmonaires et un œdème pulmonaire chez un patient âgé de 48 ans<sup>161</sup>.

Le terme MVOP a pour la première fois été introduit par Heath et coll en 1966<sup>162</sup>. Cette maladie est caractérisée par des lésions de remodelage, prédominantes sur les veines et veinules mais impliquant également les artérioles. Elle se définit plus particulièrement par une obstruction diffuse et extensive des veines de petite taille et des veinules pulmonaires. Ce remodelage entraîne une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Les patients qui en souffrent décèdent ainsi d'une défaillance cardiaque droite<sup>163-165</sup>. Le diagnostic de la MVOP est difficile à établir car elle est souvent confondue avec l'HTAP. En effet, la MVOP et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) idiopathique partagent la même présentation clinique dont le signe principal reste la dyspnée d'effort, présente dans plus de 90% des cas. L'examen complémentaire de référence est la réalisation d'un cathétérisme cardiaque droit de repos. Cette technique permet d'estimer la pression artérielle pulmonaire moyenne

(PAPm) ainsi que la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) (reflet de la pression capillaire pulmonaire (PCP)).

Chez le patient atteint d'hypertension pulmonaire, la PAPm est supérieure à 20mmHg et la PAPO est inférieure ou égale à 15mmHg<sup>164 165 166</sup>. Peu de signes sont spécifiques de la MVOP, il est donc difficile de distinguer une MVOP d'une HTAP. L'erreur de diagnostic peut avoir des conséquences très graves pour le patient car les traitements habituellement administrés pour l'HTAP peuvent déclencher des œdèmes pulmonaires et entraîner le décès d'un patient MVOP<sup>165</sup>. Pour confirmer le diagnostic d'une MVOP, une analyse histologique pulmonaire du patient s'avère nécessaire mais la biopsie pulmonaire est contre-indiquée chez ces patients. Dans les formes héréditaires, c'est le test génétique qui confirmera le diagnostic en détectant les mutations sur le gène *EIF2AK4*<sup>167</sup>.

Malgré les recherches menées sur la MVOP, les mécanismes physiopathologiques de cette maladie restent à élucider. Elle fait partie des maladies pulmonaires orphelines. La transplantation reste, au jour d'aujourd'hui, la seule thérapie viable pour les patients atteints de la MVOP<sup>165</sup>.

## b) Classification

La classification clinique des hypertensions pulmonaires a pour objectif d'individualiser des sous-groupes de la maladie présentant des similitudes dans leur physiopathologie, leur présentation clinique et leur prise en charge thérapeutique. La classification propose cinq classes d'hypertension pulmonaire. Le premier groupe représente les hypertensions artérielles pulmonaires précapillaires (Tableau 1). Dans ce groupe, se trouvent la MVOP et l'HCP, individualisées dans un sous-groupe 1.6, intitulé : « PAH with overt features of venous/capillaries (PVOD/PCH) involvement »<sup>168</sup>.

## Updated clinical classification of pulmonary hypertension (PH)

### 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

### Tableau 1 : Extrait de la classification de l'hypertension artérielle pulmonaire : groupe 1

PVOD : pulmonary veino-occlusive disease, PCH : pulmonary capillary hemangiomatosis (issu de <sup>168</sup>)

#### Signs evocative of venous and capillary (pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary capillary haemangiomatosis) involvement

<b>Pulmonary function tests</b>	Decreased DLCO (frequently <50%) Severe hypoxaemia
<b>Chest HRCT</b>	Septal lines Centrilobular ground-glass opacities/nodules Mediastinal lymph node enlargement
<b>Response to PAH therapy</b>	Possible pulmonary oedema
<b>Genetic background</b>	Biallelic <i>EIF2AK4</i> mutations
<b>Occupational exposure</b>	Organic solvent (trichloroethylene)

### Tableau 2 : Liste des signes évocateurs de la MVOP

DLCO : Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, HRCT : high resolution computed tomography, PAH : pulmonary arterial hypertension (issu de <sup>168</sup>)

Dans cette classification, la MVOP et l'HCP sont individualisées dans un même sous-groupe : le groupe des HTAP. Il est important de noter que la MVOP est caractérisée par une atteinte veinulaire prédominante alors que l'HCP, par une atteinte capillaire prédominante. Ces deux pathologies sont dorénavant reconnues comme étant indistingables<sup>169</sup>. Au vu des similitudes cliniques, hémodynamiques, histologiques et génétiques entre ces deux maladies, il est suggéré que la MVOP et l'HCP soient deux manifestations différentes d'une même maladie. La MVOP (ou HCP) fait partie du groupe 1 car elle possède des aspects cliniques et hémodynamiques identiques à l'HTAP. Cependant, leurs caractéristiques histologiques et leurs prises en charge sont différentes. Ces différences sont détaillées dans le tableau 2 du

sous-groupe 1.6. Ce tableau liste les caractéristiques spécifiques de la MVOP via les résultats des examens pulmonaires, les particularités observées en tomodensitométrie haute résolution, la réponse aux thérapies utilisées pour l'HTAP et le détail des différentes formes de la MVOP.

La MVOP existe sous une forme héréditaire (MVOPh), transmise de façon autosomique récessive, ou sporadique (MVOPs) survenant chez les sujets plus âgés et pour laquelle plusieurs facteurs de risque ont été décrits<sup>165</sup>. Tout comme l'HTAP, la MVOP peut aussi être associée à des pathologies auto-immunes, en particulier la sclérodémie<sup>170</sup>.

### c) Epidémiologie

La MVOP est une maladie très rare avec une incidence annuelle estimée de 0.1 à 0.2 cas par million<sup>171</sup>. Cependant, au vu des similitudes hémodynamiques et cliniques entre l'HTAP et la MVOP, la véritable incidence de la MVOP est probablement sous-estimée car souvent diagnostiquée comme HTAP. Il est estimé que la MVOP représente entre 5 à 10% des formes d'HTAP initialement considérées comme idiopathiques<sup>164</sup>. Cependant, chez les patients présentant des facteurs de risques connus de la MVOP (présenté dans la partie 2.2), l'incidence est plus élevée. Par exemple, l'incidence de MVOP chez les patients atteints de cancer anal et traités à la mitomycine C, est 5000 fois supérieure à celle des patients atteints de MVOP idiopathique (environ 3.9 pour 1000 cas par an)<sup>172</sup>. Ainsi l'épidémiologie des formes héréditaires et sporadiques de la MVOP, présentent plusieurs différences<sup>173,174</sup> :

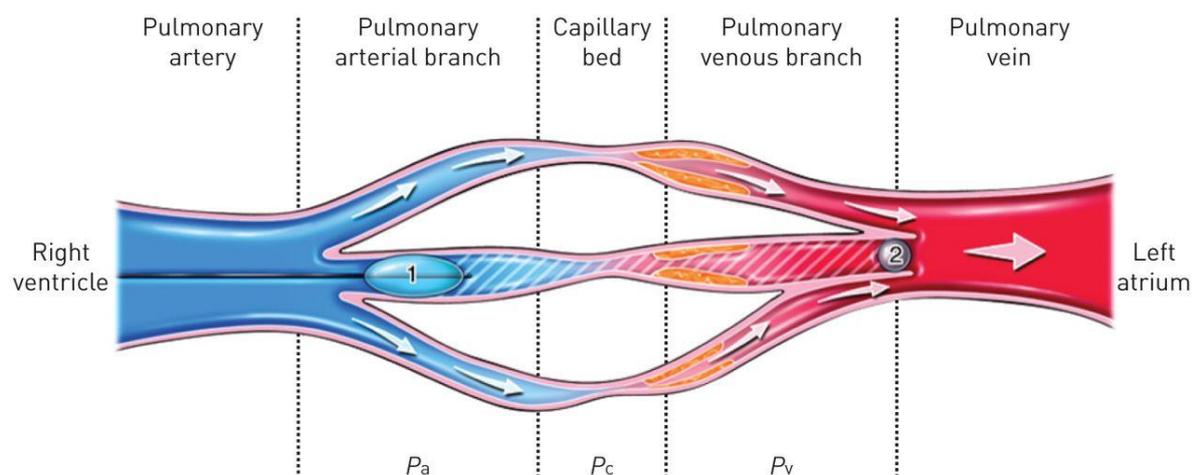
- La MVOP héréditaire survient à un âge médian de 25 ans, sans prédominance de sexe, caractérisée par des mutations bialléliques du gène EIF2AK4.
- La MVOP sporadique survient chez des sujets à un âge médian de 60 ans, avec une prédominance masculine (3/1) et une fréquente exposition aux solvants (40 %), aux chimiothérapies par agents alkylants (10 %) ou l'exposition au tabac.

### d) Diagnostic

La MVOP et l'HTAP possèdent la même présentation clinique et hémodynamique : la fatigue et l'essoufflement à l'effort. Ces symptômes étant peu spécifiques, le diagnostic est souvent posé trop tard si bien que les patients présentent déjà des symptômes d'une insuffisance cardiaque droite correspondant au stade terminal de la maladie<sup>175,176</sup>. La confirmation du diagnostic nécessite la réalisation d'un cathétérisme cardiaque droit même si la comparaison

des données hémodynamiques de patients ayant une MVOP ou une HTAP ne permet pas de distinguer les deux maladies. Une étude, regroupant un groupe de patients atteints de MVOP et un groupe de patients atteints d'HTAP idiopathique, a montré la similitude des données hémodynamiques entre les deux groupes<sup>174</sup>.

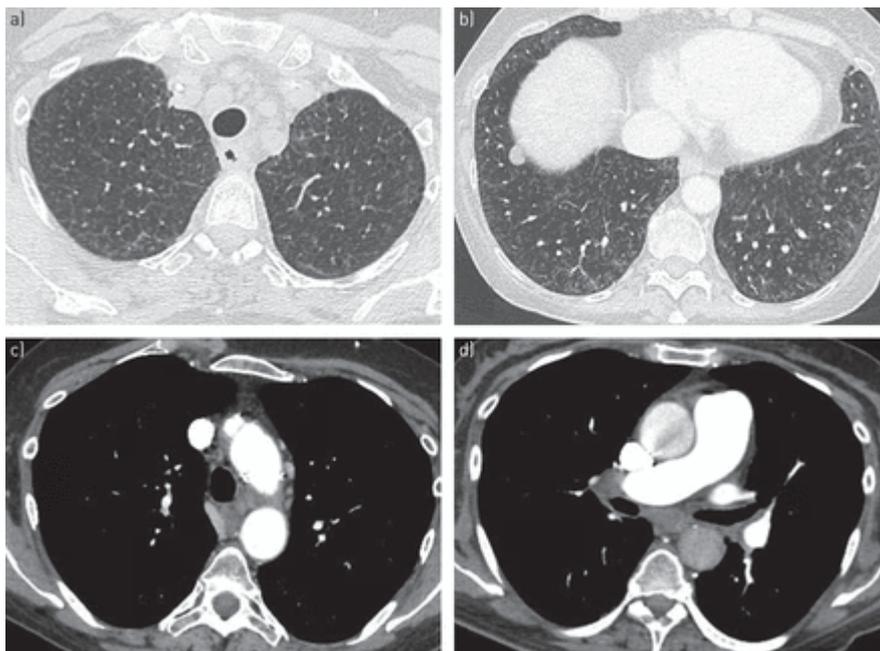
En effet, dans les deux maladies, la PAPm est supérieure à 20mmHg et les résistances vasculaires pulmonaires sont élevées. Malgré une atteinte prédominante des capillaires dans la MVOP, la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) est inférieure à 15mmHg<sup>174,177</sup>. Ainsi, malgré une obstruction post-capillaire dans la MVOP, la PAPO inférieure à 15mmHg reflète une HTAP précapillaire. La mesure de la PAPO est prise au cours d'un cathétérisme droit à l'aide d'un cathéter à ballonnet. Elle correspond à la pression à l'extrémité de la colonne statique du sang. La PAPO est donc le reflet de la pression dans une veine pulmonaire de même diamètre que la branche artérielle pulmonaire occluse. La PAPO est le reflet d'une pression dans les larges veines pulmonaires, non affectées dans la maladie MVOP, mesurant ainsi une pression en aval de l'obstruction (Figure 23).



**Figure 23 : Mesure de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) dans la MVOP.**

Dans la MVOP, ce sont les petites veines qui sont majoritairement touchées aboutissant à une augmentation de la pression veineuse ( $P_v$ ), de la pression capillaire ( $P_c$ ) et de la pression artérielle pré-capillaire ( $P_a$ ). La PAPO correspond à la pression à l'extrémité de la colonne statique du sang obstruée par le cathéter à ballonnet (1) indiquant la pression de la branche artérielle pulmonaire occluse. La PAPO est donc le reflet de la pression dans une veine pulmonaire de même diamètre (2) que la branche artérielle pulmonaire occluse, d'un diamètre souvent plus large que les veines touchées par la MVOP (issue de <sup>165</sup>)

Comme la présentation clinique et hémodynamique ne permet pas de distinguer la MVOP de l'HTAP, la confirmation diagnostique de la MVOP est anatomopathologique. Cependant, les biopsies pulmonaires sont à haut risque de complication et ne sont pas recommandées.



**Figure 24 : Image de tomодensitométrie thoracique à haute résolution caractéristique de la MVOP**  
 a) présence d'un épaissement septal b) aspect en verre dépoli c) et d) augmentation de taille des ganglions médiastinaux (issue de <sup>165</sup>)

La tomодensitométrie thoracique à haute résolution (TDM) est devenue une des approches non invasives principales du diagnostic de la MVOP. En effet, 75% des patients MVOP dont le diagnostic a été confirmé histologiquement, possèdent au moins deux des anomalies suivantes mesurées par TDM : une augmentation de taille des ganglions médiastinaux, un aspect en verre dépoli et un épaissement septal (Figure 24)<sup>173</sup>. La baisse de la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) associée à une hypoxémie profonde est également évocatrice du diagnostic. Enfin, le lavage bronchoalvéolaire des patients MVOP peut être associé à une hémorragie intra alvéolaire occulte<sup>178</sup>. Cependant, ces différents symptômes cliniques sont évocateurs de la maladie MVOP mais non spécifiques. La difficulté à établir un diagnostic n'améliore pas le pronostic des patients atteints de MVOP car il est souvent posé trop tard.

Il a été estimé qu'un patient atteint de MVOP mourrait en moyenne 11.8 mois après la confirmation du diagnostic et 24.4 mois après l'apparition des premiers symptômes<sup>179</sup>. La MVOP évolue rapidement vers l'insuffisance cardiaque correspondant au stade terminal de la maladie. Une étude dirigée sur une série de 11 patients MVOP a reporté une mortalité de 72%

dans la première année suivant le diagnostic<sup>180</sup>. La rapidité d'évolution de la maladie nécessite une prise en charge rapide du patient pour une transplantation pulmonaire qui est aujourd'hui le seul traitement possible.

### e) Traitement

Des traitements symptomatiques peuvent être administrés aux patients MVOP comme les diurétiques en cas de signes congestifs ou l'oxygénothérapie pour corriger l'hypoxémie permettant ainsi de limiter la vasoconstriction pulmonaire<sup>163</sup>.

De nombreux traitements aux propriétés vasodilatateurs et aux effets antiprolifératifs ont été développés pour l'HTAP. Cependant, l'utilisation de ces thérapies pour les patients MVOP est très controversée en raison des complications possibles. En effet, 20 à 25% de patients MVOP traités avec des thérapies destinées à l'HTAP, en particulier les inhibiteurs calciques et la prostacycline, ont entraîné des œdèmes pulmonaires engageant le pronostic vital du patient<sup>181,182</sup>. Ce risque d'œdème pulmonaire est d'autant plus augmenté lors d'une combinaison de vasodilatateurs<sup>183</sup>.

En plus d'être potentiellement dangereux chez certains patients, les thérapeutiques ciblées de l'HTAP sont moins efficaces dans la MVOP que dans l'HTAP idiopathique. Même si des études ont montré des améliorations hémodynamiques sous époprosténol intraveineux<sup>184-186</sup>, iloprost<sup>187</sup> ou sildénafil<sup>188,189</sup>, moins de 5 % des patients MVOP atteignent les critères de bonne réponse prédéfinis (Index cardiaque > 2.5 L/min par m<sup>2</sup>, distance pendant 6 min de marche > 440m, Classe fonctionnelle NYHA I ou II) sous traitements ciblés de l'HTAP<sup>182</sup>. Il est donc particulièrement important d'évoquer et d'éliminer le diagnostic de MVOP avant d'introduire des thérapeutiques ciblées de l'HTAP.

La transplantation pulmonaire reste donc aujourd'hui la seule solution thérapeutique pour les patients MVOP. Cependant, de nombreux patients décèdent, parce que soit l'attente est trop longue pour un transplant, soit le patient est trop faible pour en recevoir un. Une étude a montré que les patients atteints de MVOP ont deux fois plus de chance de mourir dans l'attente d'un transplant que les patients atteints d'HTAP malgré un temps d'attente similaire<sup>190</sup>.

## 2.2. Forme sporadique de la MVOP

### a) Facteurs déclenchants

- Chimiothérapie

Plusieurs études ont montré qu'un nombre non négligeable de patients traités par chimiothérapie déclenchait par la suite une MVOP<sup>191</sup>. La MVOP déclenchée à la suite d'une chimiothérapie a aussi été reportée chez les patients traités pour les cancers pédiatriques ou suite à une transplantation de la moelle épinière<sup>192-193</sup>. La chimiothérapie est l'administration d'un ensemble de médicaments permettant de traiter certaines maladies comme les cancers ou les maladies auto-immunes. La diversité des médicaments utilisés entraîne des difficultés dans l'identification de celui déclenchant la MVOP. Une équipe a cependant découvert que l'administration des agents alkylants est un des traitements majoritairement responsable du déclenchement de la MVOP chez ces patients<sup>194</sup>. De plus, une corrélation entre l'administration de la mitomycine C (agent alkylant) pour le traitement contre le cancer anal et le développement de la MVOP a été mise en évidence. L'incidence de la MVOP chez les patients atteints de cancer anal serait de 3,9 cas sur 1000 patients par an, bien plus élevée que le taux d'incidence des MVOP idiopathiques (0,5 cas par millions de personne par an)<sup>172</sup>.

- Exposition aux solvants organiques

Une exposition aux solvants organiques semble être un facteur de risque pour le déclenchement de la MVOP. Une étude comparant deux cohortes de patients atteints de MVOP et de HTAP, a démontré que 42% des patients MVOP avaient été exposés au trichloréthylène contre 3% des patients HTAP. Les patients MVOP ayant été exposés aux solvants organiques présentent un âge avancé et une absence de la mutation *EIF2AK4*<sup>195</sup>.

- Tabac

L'exposition au tabac a été démontrée comme étant plus élevée chez les patients MVOP que chez les patients HTAP idiopathiques<sup>173</sup>. Il est important de noter que les patients MVOP exposés au trichloréthylène (paragraphe précédent) sont aussi exposés régulièrement au tabac, suggérant ainsi un lien entre la combinaison des deux expositions et le développement de la MVOP chez ces patients<sup>195</sup>. Chez les patients atteints de HP, le tabac est un facteur

participant au dysfonctionnement endothélial et au remodelage vasculaire<sup>196-197</sup>. Cependant, aucune étude n'explique pourquoi l'exposition du tabac est associée au déclenchement de la MVOP.

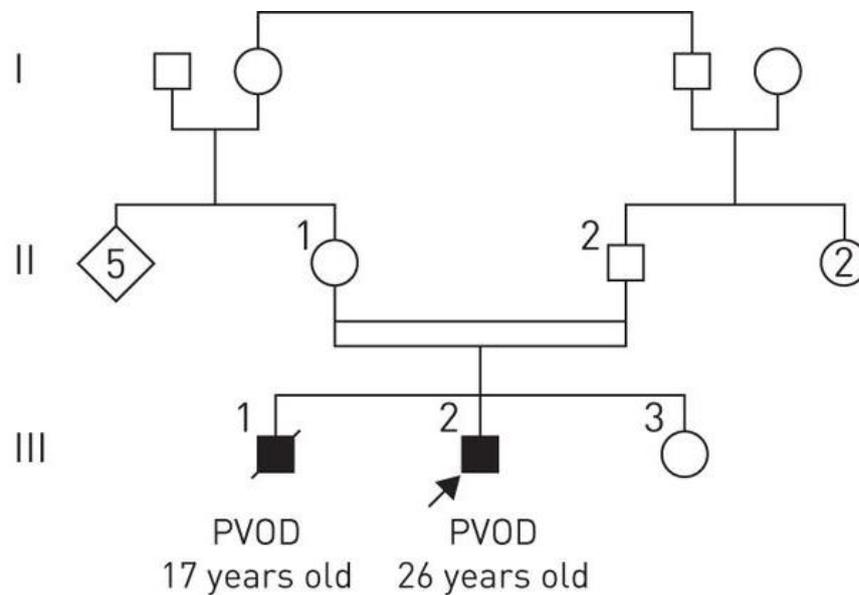
#### b) Modèles animaux

Lorsque les agents alkylants ont été identifiés comme un facteur déclenchant de la MVOP, des modèles animaux ont été explorés afin d'étudier les cas de MVOP induit par chimiothérapie. L'administration de cyclophosphamide (un agent alkylant) a déclenché une hypertension pulmonaire chez trois espèces : souris, rat et lapin<sup>194</sup>. Chez le rat, l'injection intrapéritonéale de mitomycine-C (MMC) induit le développement de la MVOP, caractérisée par l'augmentation de la mPAP, le remodelage des veines pulmonaires et une prolifération intense des cellules endothéliales<sup>172</sup>. Aujourd'hui, le rat injecté à la MMC est le seul modèle animal permettant d'explorer les mécanismes physiopathologiques de la forme sporadique de la MVOP. Aucune étude n'a encore mis au point un modèle animal de la MVOP suite aux expositions de solvants ou/et de tabac.

## 2.3. Forme héréditaire de la MVOP

### a) Mutation *EIF2AK4*

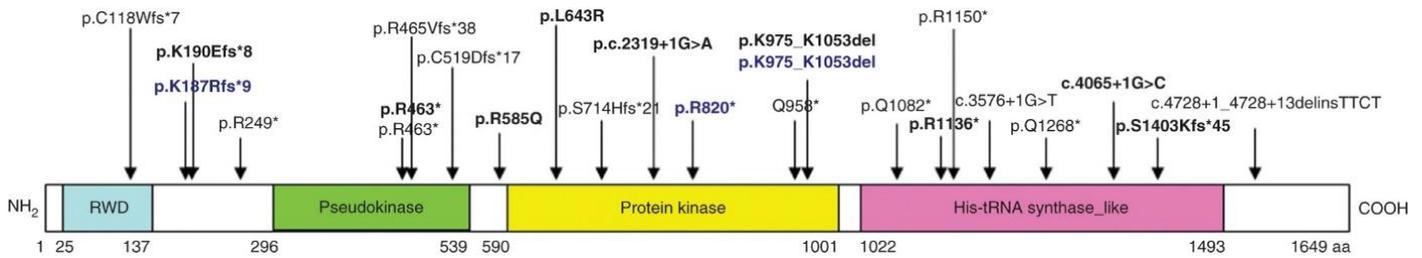
En 2014, treize familles porteuses de la MVOP au sein du Centre de référence de l'HTAP ont été analysées. En étudiant la généalogie de ces familles, les chercheurs ont découvert que la maladie ne touchait qu'une seule génération et que la consanguinité augmentait le risque d'être porteur de la MVOP (Figure 25).



**Figure 25 : Schéma d'une famille porteuse de la maladie veino-occlusive pulmonaire héréditaire (MVOPh)**

La MVOPh causée par la mutation biallélique du gène *EIF2AK4*, est transmise de façon autosomique récessive : il n'y a qu'une seule génération touchée par la maladie, sans différence de sexe entre les atteints et la consanguinité est souvent présente. Les hommes sont représentés par un carré et les femmes, par un cercle. Les sujets atteints sont représentés en noir et les personnes décédées sont barrées (issue de <sup>167</sup>)

Ces deux observations semblent indiquer que la maladie ait été transmise de façon autosomique récessive. Cela a été confirmé lorsque les chercheurs ont identifié les mutations bialléliques du gène *EIF2AK4* présentes dans les treize familles (Figure 26) <sup>167</sup>.



**Figure 26 : Localisation des mutations du gène *EIF2AK4* détectées chez les patients atteints de la MVOP**

Les mutations identifiées chez les patients atteints de MVOPh sont écrites sous la forme : p(protéine).(Abréviation acide aminé)(localisation)(Type de mutation). Les mutations homozygotes sont en gras, les autres mutations sont sous forme hétérozygotes. fs : frame shift, del : délétion, G>T : G est remplacé par T, \* : codon stop (issue de <sup>167</sup>)

Ces résultats ont été vérifiés dans d'autres études confirmant ainsi la mutation *EIF2AK4* comme responsable du déclenchement de la maladie MVOPh<sup>198</sup>. L'identification de cette mutation biallélique *EIF2AK4* chez un patient permet ainsi de différencier une HTAP d'une MVOPh. De plus, cette mutation a aussi été identifiée dans 9% (7 cas sur 81) des cas sporadiques de MVOP survenant chez des sujets jeunes.

Il est difficile d'évaluer la pénétrance de la MVOP chez les porteurs de la mutation *EIF2AK4*. Au vu des résultats de cette étude, celle-ci semble élevée. Les porteurs de la mutation déclenchant la maladie à des âges variables selon les sujets<sup>167</sup>, depuis la période néo-natale jusqu'à l'âge adulte. Cela souligne le fait qu'un facteur supplémentaire, génétique, épigénétique ou environnemental, pourrait donc initier le déclenchement de la maladie et son développement<sup>174</sup>.

## b) Modèles animaux

Afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la MVOPh liés à la mutation *EIF2AK4*, des modèles murins avec invalidation de ce gène peuvent être étudiés. Ce gène code pour la protéine GCN2 (Voir chapitre 1). Les animaux sont nommés *Gcn2* KO ou *Gcn2*<sup>-/-</sup>. Contrairement à l'homme, la perte de fonction biallélique d'*EIF2AK4* seule n'est pas suffisante pour induire la MVOP chez la souris selon les résultats du laboratoire. Cela suggère ainsi une différence inter-espèces dans les mécanismes moléculaires de la maladie.

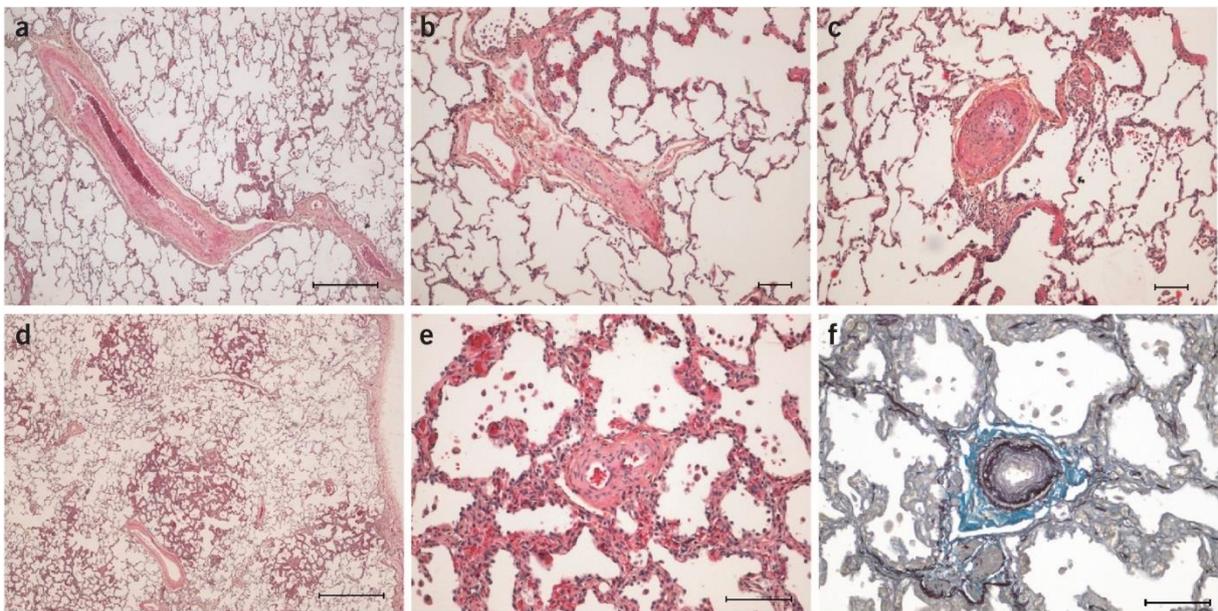
Un autre modèle de souris génétiquement modifié a été proposé par l'équipe de Lathen et coll pour entraîner une MVOP. Cette équipe a généré des souris KO endothélial-spécifique

pour *Erg* et *Aplnr*. Dans ce modèle, les souris présentent une augmentation de prolifération endothéliale et un remodelage des veinules post-capillaires<sup>199</sup>. Cependant, l'expression de *Gcn2* est inchangée chez ces souris déficientes en *Erg* et *Aplnr*, supposant là, un mécanisme indépendant de la mutation EIF2AK4. Par ailleurs, ce modèle ne reproduit qu'une partie des lésions veineuses retrouvées chez les patients MVOP.

## 2.4. Physiopathologie de la MVOP

### a) Anatomopathologie de la MVOP

La MVOP se définit par une obstruction diffuse et extensive des veines de petite taille et des veinules pulmonaires par du tissu fibreux aboutissant à un rétrécissement ou une obstruction de la lumière du vaisseau (Figure 27 a-b)<sup>200</sup>. La média des veines septales et préseptales peut devenir muscularisée. Dans des formes secondaires de la maladie, une obstruction des larges veines septales peut être observée. Il est important de noter que seule, l'atteinte des veinules préseptales est considérée comme un élément diagnostique spécifique de la MVOP.



**Figure 27 : Lésions histologiques de la maladie veino-occlusive pulmonaire**

(a) Veine septale associée d'une fibrose intimale et d'un épaissement de sa paroi vasculaire. Echelle : 500  $\mu$ m. (b) Veinule obstruée par de la fibrose intimale. Echelle : 100  $\mu$ m. (c) Remodelage intimal d'une artère pulmonaire. Echelle : 100  $\mu$ m. (d) Hémangiomatose capillaire, lésions caractéristiques d'une HCP. Echelle : 1000  $\mu$ m. (e) Remodelage vasculaire avec des artères et artérioles muscularisées. Echelle : 100  $\mu$ m. (f) Artère avec une intima très fibrosée. Echelle: 100  $\mu$ m. Coloration hématoxyline et éosine ; a-e, coloration orceïne ; f. (issue de <sup>167</sup>)

Le remodelage intimal des veines et des veinules peut varier d'un tissu fibreux en composition cellulaire très hétérogène à des lésions sclérotiques denses et paucicellulaires. Représentés comme des dépôts pigmentés noirs, des dépôts de calcium peuvent s'accumuler dans les fibres élastiques de la paroi. Les occlusions thrombotiques aggravent les lésions vasculaires et une recanalisation peut engendrer des lésions dite « passoire »<sup>178</sup>.

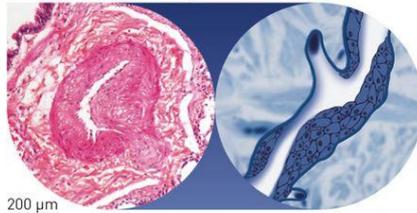
De plus, une prolifération des cellules endothéliales est présente majoritairement au niveau de la paroi des capillaires. Un épaissement des cloisons alvéolaires est aussi habituellement observé aboutissant à des capillaires alvéolaires dilatés et obstrués<sup>201</sup> (Figure 27d). Cette prolifération est aussi caractéristique de l'hémangiomatose capillaire (HCP). L'individualisation de l'HCP et de la MVOP a été remise en cause lorsqu'une étude a montré qu'une atteinte veinulaire était présente dans 80% des cas d'HCP et que des proliférations capillaires étaient associées aux atteintes veinulaires dans 85% des cas de MVOP<sup>182</sup>. Les études génétiques ont confirmé qu'il s'agissait de formes différentes de la même maladie en retrouvant le gène *EIF2AK4* commun aux deux maladies<sup>167,202</sup>.

Dans certains cas de MVOP, une augmentation de la quantité d'hémosidérine est observée dans les macrophages alvéolaires, dans les pneumocytes ainsi que sous forme de dépôt dans l'interstitium pulmonaire confirmant ainsi la présence d'hémorragies alvéolaires occultes<sup>178</sup>.

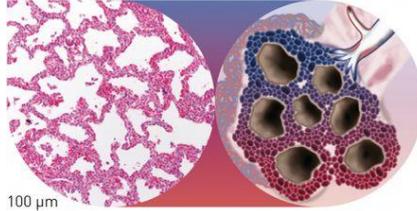
Des différences histologiques existent entre la MVOP héréditaire et la MVOP sporadique. En effet, une fibrose intimale des artères pulmonaires et une hyperplasie musculaire des veines septales sont plus sévères chez les patients porteurs de la mutation que chez les patients non porteurs<sup>203</sup>.

Lesions of PVOD

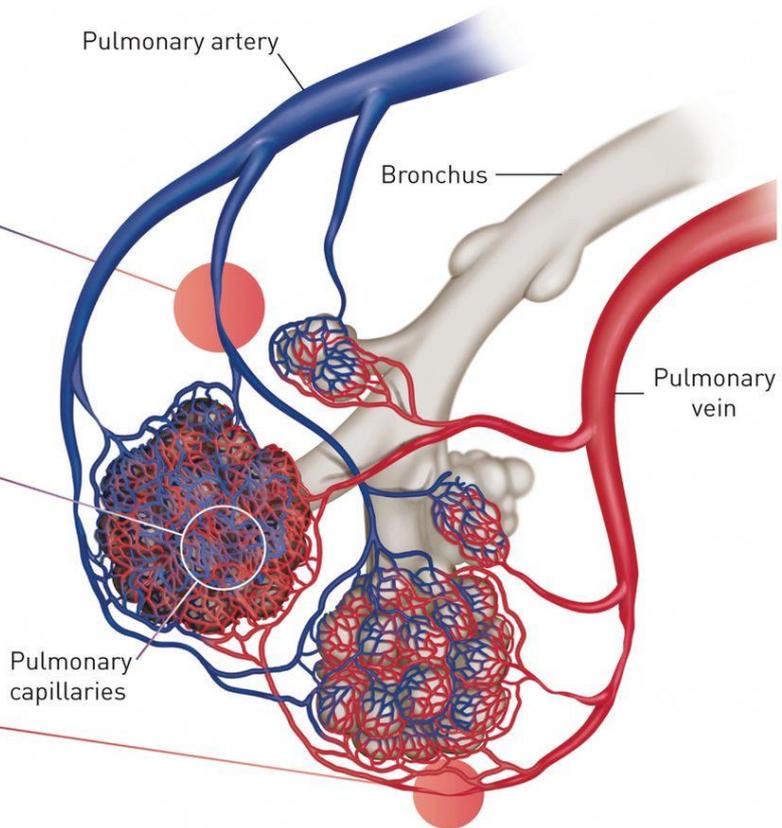
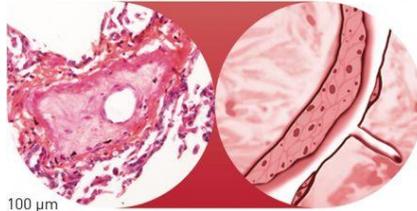
Pulmonary artery



Pulmonary capillaries



Pulmonary vein



**Figure 28 : Lésions vasculaires de la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP)**

Les trois vaisseaux sanguins sont caractéristiques d'une MVOP. Les veines pulmonaires, en particulier les veinules, et les veinules pré-septales, sont majoritairement obstruées par de la fibrose intimale. Les lésions capillaires sont caractérisées par une prolifération endothéliale. Les artères pulmonaires présentent une fibrose intimale et une hypertrophie de la média (issue de <sup>165</sup>).

Les formes de maladies vasculaires pulmonaires ont tendance à être différenciées selon leurs vaisseaux de prédilection. Ainsi, l'atteinte des artères pulmonaires muscularisées et des veines/veinules, est respectivement associée à une HTAP et une MVOP. Cependant, des études récentes ont montré plusieurs similitudes entre les maladies veineuses et artérielles. Dans une étude, 75% des patients atteints d'HTAP associé à une maladie du tissu conjonctif (groupe 1.4.1 dans la classification des hypertensions pulmonaire) présentent des lésions vasculaires veineuses. Malgré la prédominance des lésions capillaires et post capillaires, un remodelage des artères et des artérioles pulmonaires est aussi associé à l'atteinte veinulaire dans la grande majorité des cas de MVOP<sup>203</sup>. Ainsi les lésions artériolaires observées dans la MVOP sont similaires à celle de l'HTAP. Cependant les lésions plexiformes restent une caractéristique spécifique de la HTAP et ne sont pas observées chez les patients MVOP<sup>165</sup>.

Ces observations soulignent la ressemblance entre les différentes formes d'hypertension pulmonaire. Une analyse histologique approfondie du poumon apparaît donc nécessaire pour affirmer le diagnostic de la MVOP<sup>204</sup>.

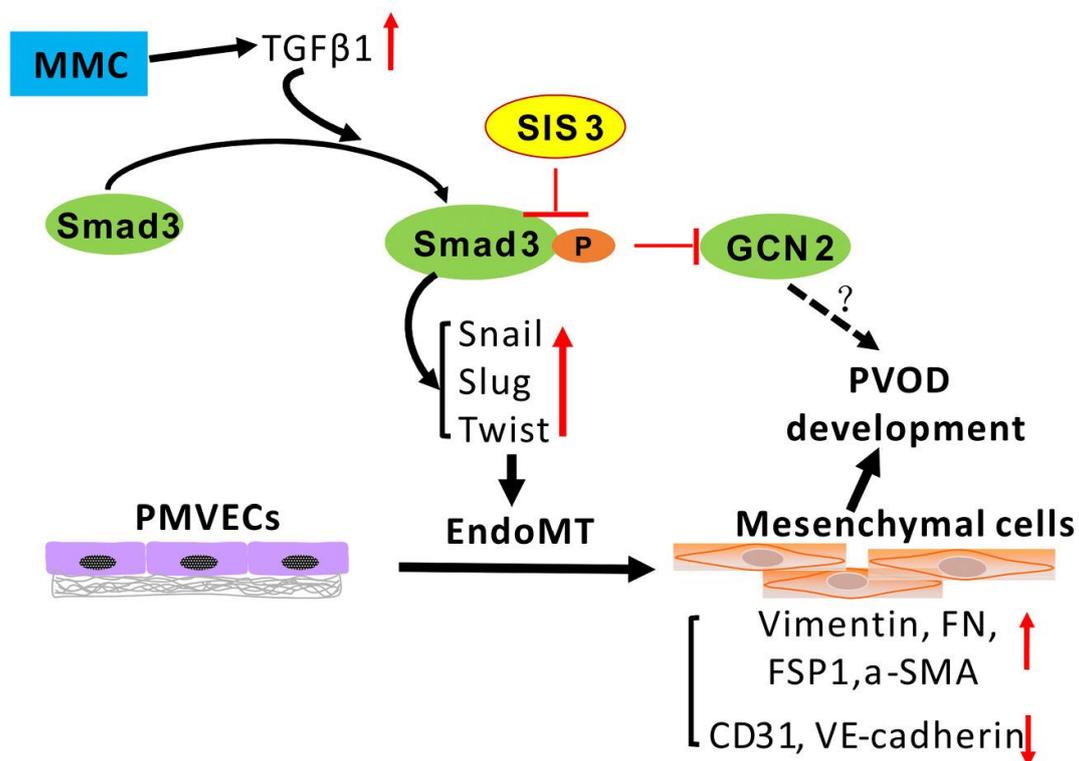
### b) Pathogénèse de la MVOP

Contrairement à l'HTAP, les mécanismes physiopathologiques sont très peu définis dans la MVOP. Du fait des similitudes histologiques entre l'HTAP et la MVOP, il est supposé que certaines voies de signalisation soient communes entre les deux maladies.

L'inflammation a été une des voies explorées chez les patients MVOP. Perros et coll ont montré que la MVOP est associée à des anomalies du compartiment leucocytaire cytolytique (cellules natural killer (NK), natural killer T lymphocyte (NKT), et CD8<sup>+</sup> T cytotoxique (CTL)). La proportion des CTL et des NKT est diminuée tandis que la proportion des NK est augmentée dans les poumons de patients MVOP. De plus, une hyperméthylation du gène de la granulysine (GNLY) induisant une altération de la régulation épigénétique du gène GNLY, ainsi qu'une diminution de la GNLY dans les cellules cytotoxiques circulantes, sont observées chez les patients MVOP. Ces anomalies ne se retrouvent pas dans l'HTAP idiopathique<sup>205</sup>. À la vue du rôle essentiel de ces cellules cytolytiques et de la granulysine dans la réponse immunitaire, ces résultats laissent supposer qu'un dérèglement immunitaire participe à la pathogénèse de la MVOP.

Pour les patients présentant une mutation bi-allélique du gène *EIF2AK4*, les mécanismes moléculaires impliqués pourraient être liés à un déficit des voies de signalisation dépendantes de GCN2. Cependant, les mécanismes induisant le déclenchement de la maladie liés à la perte de fonction de GCN2 restent inconnus à ce jour. Il est important de noter que le niveau protéique de GCN2 est abaissé dans les poumons des patients HTAP *BMPR2* mutés, les patients HTAP idiopathiques et les patients MVOP sporadiques. On le note aussi dans le modèle de rat MVOP (par agent alkylant) et le rat *Bmpr2* muté<sup>172,203</sup>. Ainsi, ces résultats suggèrent que la perte ou la diminution d'expression de GCN2 serait une voie pathologique commune aux différentes formes d'HTAP et de MVOP.

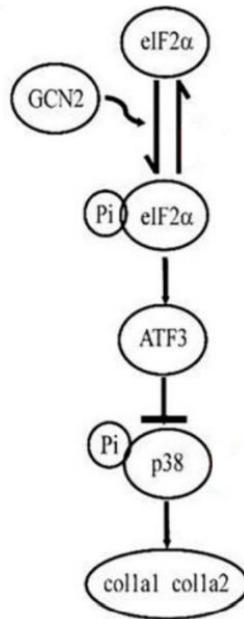
La transition endothéliale mésenchymateuse (endoMT) est un processus qui a tout d'abord été identifiée chez les patients atteints d'HTAP<sup>206</sup>. Cependant, une étude a aussi observé une transition endoMT dans le système microvasculaire des patients atteints de MVOP. Étudié chez le rat mitomycine, le processus endoMT serait une conséquence de l'activation de la voie TGF- $\beta$ -Smad3 conduisant à l'augmentation d'expression des facteurs de transcription Snail, Slug et Twist<sup>207</sup>. Il semblerait que GCN2 ne soit pas impliqué dans le processus endoMT (Figure 29).



**Figure 29 : Mécanisme conduisant à une transition endothéliale mésenchymateuse chez le rat traité à la mitomycine**

Le traitement mitomycine active la voie du TGF- $\beta$ /Smad3. La phosphorylation de smad3 induit l'augmentation d'expression des facteurs de transcription Snail, Slug et Twist1 qui sont connus pour jouer un rôle pathogène dans la transition endothéliale mésenchymateuse (issue de <sup>207</sup>)

Une récente étude a montré que la perte de fonction de GCN2 dans les cellules musculaires lisses des patients MVOP porteurs de la mutation *EIF2AK4* augmente la production de collagène A1 et A2 par une corrélation négative entre la voie ATF3 et la voie p38-MAPK (Figure 30). Cette augmentation de production de collagène dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires peut favoriser le dépôt de collagène sur les parois des vaisseaux pulmonaires<sup>208</sup>.



**Figure 30 : Mécanisme justifiant l'augmentation de production de collagène dans les cellules musculaires lisses des patients porteurs de la mutation EIF2AK4 atteints de MVOP héréditaire**

ATF3 est induit par l'activation de l'ISR (*integrated stress response*) via GCN2. Comme ATF3 inhibe la phosphorylation de p38, la perte de fonction de GCN2 induit ainsi une augmentation de la phosphorylation de p38. Cette phosphorylation conduit à l'augmentation de production des collagènes A1 et A2 dans les cellules musculaires lisses des patients atteints de MVOP héréditaire (adaptée de <sup>208</sup>)

Enfin, Lathen et coll ont montré que les gènes *ERG* et *APLNR* influent sur la prolifération des cellules endothéliales pulmonaires dans un modèle de souris KO. Or, les patients atteints de MVOP présentent une perte des facteurs *ERG* et *APLNR* comparés aux patients contrôles<sup>209</sup>. Ainsi, ces gènes seraient impliqués dans le développement des plaques hémangiomeuses observées chez les patients atteints de MVOP sporadique. Aucun lien n'a encore été trouvé entre GCN2 et ces gènes.

## 3. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

---

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et sévère caractérisée par une augmentation des résistances pulmonaires liées à la prolifération cellulaire de la paroi des petites artérioles pulmonaires de 500µm. Sa prévalence minimale en France est estimée à 15 cas par million d'adultes. En l'absence de traitement, les patients décèdent de défaillance cardiaque droite. Contrairement à la MVOP, les mécanismes physiopathologiques sont mieux connus, ce qui a permis l'élaboration de différents traitements contre la maladie.

### 3.1. Définition générale de l'HTAP

#### a) Définition

L'HTAP est une maladie rare avec une prévalence minimum de 25 cas par million. Il existe différentes formes d'HTAP. La forme idiopathique, la forme héréditaire et la forme sporadique. Toutes ces formes d'HTAP sont caractérisées par une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires avec une pression pulmonaire supérieure à 20mmHg. Cette résistance est liée à la prolifération cellulaire de la paroi des petites artérioles pulmonaires (inférieure à 500µm). Un dysfonctionnement des cellules endothéliales entraîne une diminution de la production de substance vasodilatatrice/dilatatrice (telle que le monoxyde d'azote ou la prostacycline) et l'augmentation de substance vaso-constructive et proliférative (telle que l'endothéline). Différents types cellulaires sont impliqués dans le remodelage vasculaire (les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales ainsi que les cellules inflammatoires). Or, ce remodelage vasculaire par prolifération intima et médiale est considéré comme un élément clé dans l'HTAP. La vasoconstriction, le remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaire et la thrombose sont les facteurs principaux contribuant à l'augmentation des résistances pulmonaires dans l'HTAP. A terme, l'augmentation de la résistance cause une défaillance cardiaque droite. La découverte de ces anomalies hémodynamiques a permis l'élaboration de différents médicaments : des inhibiteurs des récepteurs de l'endothéline, des inhibiteurs de la phosphodiesterase V et plusieurs dérivés de Prostacyclin. Ces médicaments améliorent les symptômes de la maladie, la tolérance à l'effort, l'hémodynamique de ces patients ainsi que leurs survies.

## b) Classification

L'hypertension pulmonaire (HTP) est un syndrome qui regroupe plusieurs maladies dont le point commun est l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire. La classification établie lors du dernier congrès mondial sur l'hypertension pulmonaire visait à répertorier des catégories d'HTAP partageant la même physiopathologie ainsi que des caractéristiques cliniques et des options thérapeutiques similaires. Elle a permis de définir des groupes de patients homogènes afin de réaliser des études cliniques et d'obtenir l'approbation de traitements spécifiques de l'HTAP dans le monde<sup>210</sup>. Au sein de la catégorie HTAP, sept groupes d'HTAP ont été définis :

- Groupe 1.1 : HTAP idiopathique correspondant à la forme sporadique de la maladie en l'absence d'antécédent familial d'HTAP ou de facteur de risque identifié.
- Groupe 1.2 : HTAP familiale associée à des anomalies génétiques.
- Groupe 1.3 : HTAP induite par des médicaments ou des toxines.
- Groupe 1.4 : HTAP associée aux différentes pathologies (connectivites, VIH, élévation de la pression dans la circulation portale, cardiopathie congénitale, infection parasitaire du bilharziose).
- Groupe 1.5 : HTAP associée aux répondeurs à long terme aux antagonistes calciques.
- Groupe 1.6 : HTP avec signes évoquant une maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou une hémangiomatose capillaire pulmonaire.
- Groupe 1.7 : HTP persistante du nouveau-né.

## c) Epidémiologie

L'HTAP est une maladie rare dont la prévalence mondiale est estimée à environ 15 à 50 cas par million d'habitants<sup>211</sup>. Comme pour la MVOP, cette prévalence est probablement sous-

estimée. La forme idiopathique est la plus commune représentant plus de 30 à 50% des HTAP dans le monde occidental<sup>212,213</sup>. L'âge moyen du diagnostic est autour de 50 à 65 ans pour les formes idiopathiques d'HTAP et plus basse chez les formes hérissables d'HTAP compris entre 31 et 45 ans. Il existe une prédominance féminine de la maladie<sup>214</sup>. En effet, les études cliniques ont montré que 62% à 80% des patients HTAP étaient de sexe féminin<sup>215</sup>, en particulier pour la forme hérissable où la pénétrance de la mutation BMPR2 est estimée à 42% chez les femmes et 14% chez les hommes<sup>216</sup>. Paradoxalement, les hommes atteints d'HTAP sont indépendamment exposés à une plus forte mortalité<sup>217</sup>. L'influence du sexe sur les mécanismes de la maladie n'est pas encore élucidée.

#### d) Diagnostic

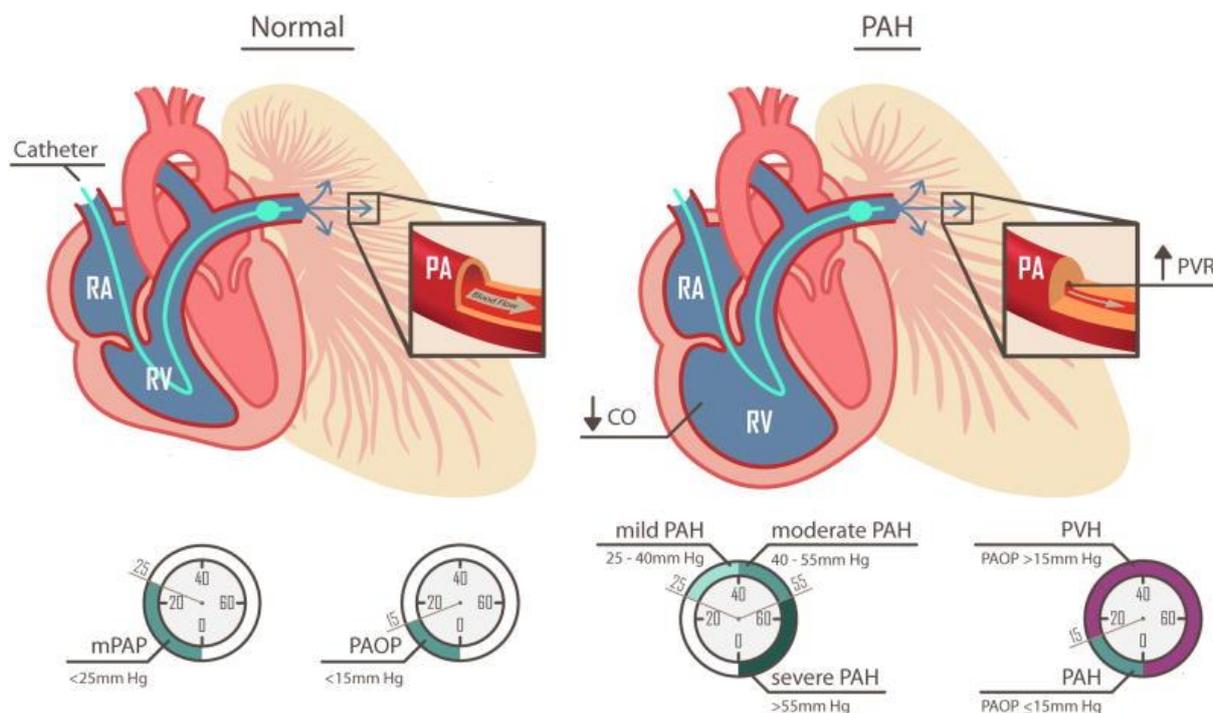
Le diagnostic de l'HTAP a longtemps été porté tardivement. Le diagnostic d'une HTAP est souvent évoqué dans deux cadres contextuels :

- Lors d'exploration de symptômes souvent peu spécifiques mais évocateurs comme une dyspnée d'effort inexpliquée.
- Lors d'une recherche systématique de l'HTAP débutante dans des circonstances favorissantes préalablement identifiées (dépistage ou connaissance d'un facteur de risque).

La symptomatologie clinique de l'HTAP est non spécifique. Le symptôme de la dyspnée à l'effort est présent dans plus de 90% des cas d'HTAP ; des douleurs thoraciques et des palpitations sont rapportées respectivement dans 46% et 33% des cas.

L'examen clé du dépistage de l'HTAP est l'échographie cardiaque. Cet examen permet, en effet, d'estimer le niveau de pression artérielle pulmonaire (PAP) et d'évaluer son retentissement sur les cavités droites en mesurant différents paramètres : résistance vasculaire pulmonaire (RVP), taille ventricule gauche/Ventricule droit et fonction systolique droite<sup>218</sup>.

Bien que l'échocardiographie permette de dépister l'HTAP, une confirmation par la réalisation d'un cathétérisme cardiaque droit est essentiel pour confirmer le diagnostic. L'HTAP est définie par une PAPm supérieure à 20mmHg au repos, associée à une pression capillaire inférieure à 15mmHg et une RVP supérieure à 3 unités de Wood (Figure 31).



**Figure 31 : Schéma d'une mesure de pression pulmonaire par cathétérisme droit pour le diagnostic de l'HTAP**  
(Issue de <sup>219</sup>)

Néanmoins, le consensus est de ne pas baser l'introduction des traitements spécifiques de l'HTAP sur les données de ces examens. En effet, ces examens ne permettent pas de différencier les différentes formes d'HTP. Des tests supplémentaires doivent donc être réalisés pour déterminer à quel groupe d'HTP appartient la maladie comme par exemple : les épreuves fonctionnelles respiratoires ou la tomographie par ordinateur thoracique<sup>219</sup>. Enfin, le diagnostic peut être précoce en présence d'une condition associée préalablement identifiée. Une stratégie de dépistage est mise en place en fonction du contexte du patient (Tableau 3).

Substrate	Further Assessment	Rationale
BMPR2 mutation	Echocardiogram yearly; RHC if echocardiogram demonstrates evidence of PAH (high right ventricular systolic pressure or right heart chamber enlargement)	Early detection of PAH; 20% chance of developing PAH

1st degree relative of patient with BMPR2 mutation or within pedigree of 2 or more patients with a diagnosis of PAH	Genetic counseling and recommendation for BMPR2 genotyping; proceed as above if positive	Autosomal dominant transmission
Systemic sclerosis	Echocardiogram yearly; RHC if echocardiogram demonstrates evidence of PAH (high right ventricular systolic pressure or right heart chamber enlargement)	About 8% (by RHC) –27% (by echocardiogram screening) prevalence of PAH in systemic sclerosis (27,78)
HIV infection	Echocardiogram if symptoms or signs suggestive of PAH; RHC if echo demonstrates evidence of PAH (high right ventricular systolic pressure or right heart chamber enlargement)	0.5% prevalence of PAH
Portal hypertension	Echocardiogram if OLT considered; RHC if echocardiogram demonstrates evidence of PAH (high right ventricular systolic pressure or right heart chamber enlargement)	4% prevalence of PAH in candidates for OLT; PAH is predictive of poor OLT outcome
Prior appetite suppressant use (fenfluramine)	Echocardiogram only if symptomatic	Incidence of PAH is approximately 0.005% if agent used greater than 3 months
Congenital heart disease with shunt	Echocardiogram and RHC at time of diagnosis; consider repair of defect if significant L-R shunt present	High probability of PAH developing in unrepaired shunt (Eisenmenger syndrome)
Recent acute pulmonary embolism	Ventilation-perfusion (V/Q) scintigraphy 3 months after event if symptomatic; pulmonary angiogram if positive	3% risk of chronic thromboembolic PH; negative VQ scan excludes chronic thromboembolism
Sickle cell disease	Echocardiogram yearly; RHC if echocardiogram demonstrates evidence of PAH (high right ventricular systolic pressure or right heart chamber enlargement)	Increased mortality if PH present, early detection of PH, 30% develop PH, about 10

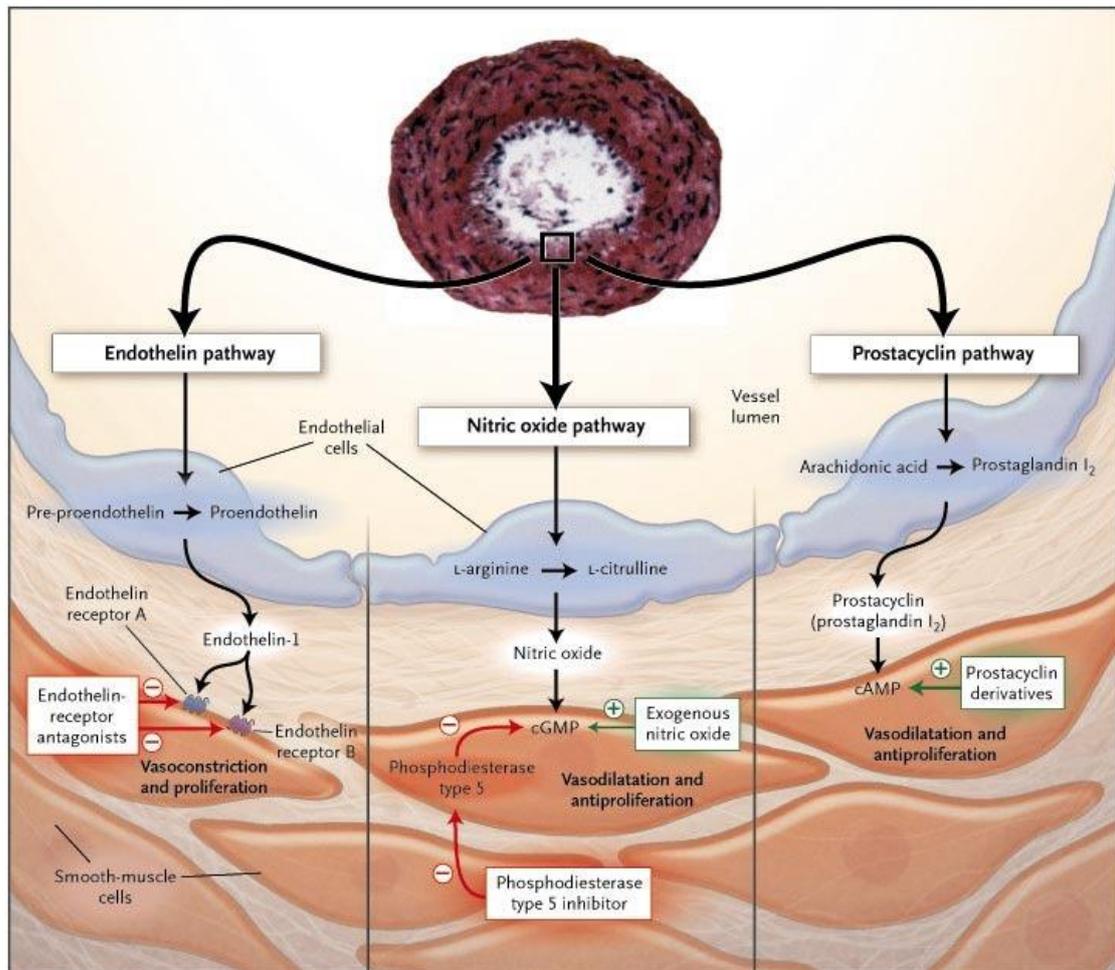
**Tableau 3 : Dépistage recommandé en fonction du contexte**  
(issue de <sup>220</sup>)

Une fois le diagnostic posé, différents traitements sont proposés aux patients. Ces traitements diffèrent en fonction du groupe d'HTAP auquel appartient la malade démontrant l'importance du diagnostic.

### e) Traitement

Il existe des traitements symptomatiques comme les anticoagulants<sup>221</sup>, les diurétiques en association avec un régime sans sel et l'oxygénothérapie<sup>222</sup>.

Les traitements spécifiques de l'HTAP tentent de s'opposer aux effets délétères de la vasoconstriction, de l'obstruction vasculaire pulmonaire par remodelage ou thrombose et de l'insuffisance cardiaque droite. Les principaux traitements actuels de l'HTAP ont pour cible la dysfonction endothéliale des artères pulmonaires (Figure 32).



**Figure 32 : Cibles des traitements actuels de l'hypertension artérielle pulmonaire**

Trois voies de signalisations impliquées dans la prolifération et la contraction des cellules musculaires lisses dans la paroi des artères pulmonaires des patients HTAP sont présentées sur le schéma. Ces voies de signalisation correspondent aux principales cibles thérapeutiques de l'HTAP. En tête de figure, l'artère pulmonaire (diamètre < 500µm) d'un patient HTAP montre une prolifération intimale et une hypertrophie de la média. La dysfonction endothéliale se traduit par une diminution de la production de la prostacycline et de monoxyde d'azote associée à une augmentation de la production d'endothéline 1. Ces modifications conduisent à une vasoconstriction et une prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Les principales thérapies de l'HTAP ont pour but de corriger les déséquilibres induits par la dysfonction endothéliale. cAMP = Adénosine monophosphate cyclique, cGMP = Guanosine monophosphate cyclique (issue de <sup>223</sup>)

- Les inhibiteurs calciques

Malgré leur faible efficacité sur le remodelage pulmonaire, les inhibiteurs calciques peuvent influencer sur la vasoconstriction. Ils peuvent donc être utilisés chez certains patients dont les

phénomènes de vasoconstriction prédominent sur les phénomènes de remodelage. Ces patients dits « répondeurs » sont identifiés par un test hémodynamique (une diminution de la PAPm de 10 mmHg minimum et inférieur à 40 mmHg et un débit cardiaque normal ou élevé)<sup>224</sup>. Malheureusement ils ne représentent qu'environ 10% de l'ensemble des patients présentant une HTAP idiopathique<sup>225</sup>. Dans les autres formes d'HTAP, en particulier d'origine génétique, les répondeurs aux inhibiteurs calciques sont exceptionnels<sup>226</sup>.

- Les dérivés de la prostacycline

La prostacycline (PGI<sub>2</sub>) est produite par les cellules endothéliales et entraîne une relaxation du muscle lisse vasculaire ainsi qu'une inhibition de l'agrégation plaquettaire par le biais d'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique. De plus, ses effets anti-prolifératifs sur les cellules musculaires lisses (CML) rendent les dérivés de la PGI<sub>2</sub> particulièrement intéressants pour le traitement de l'HTAP.

Le traitement par PGI<sub>2</sub> a prouvé qu'il apportait une amélioration significative des symptômes cliniques et hémodynamiques ainsi qu'une réduction de la mortalité. Ce traitement est indiqué et approuvé pour l'HTAP idiopathique, familiale ou associé aux connectivités<sup>227</sup>. Des complications peuvent survenir à cause du mode d'administration par cathéter comme une thrombose ou une infection<sup>228</sup>. Ainsi, certains dérivés de la PGI<sub>2</sub>, délivrés sous d'autres formes (sous-cutanée, inhalée ou orale), ont été développés<sup>229</sup>.

- Antagonistes des récepteurs de l'endothéline

L'endothéline 1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur et un facteur favorisant la prolifération des CML, contribuant ainsi à l'augmentation du tonus vasculaire pulmonaire et à l'hypertrophie des parois artérielles pulmonaires.

Il existe trois antagonistes des récepteurs de l'endothéline sur le marché :

- Le bosentan : antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline améliorant les capacités à l'effort, l'hémodynamique et allonge le délai avant aggravation clinique<sup>230</sup>.

- Le sitaxsentan : antagoniste sélectif des récepteurs A de l'ET-1 possédant un effet très positif sur le test temps de marche 6 minutes et l'hémodynamique<sup>231</sup>.

- L'ambrisentan : autre antagoniste sélectif des récepteurs A de l'ET-1 ayant les mêmes effets positifs que le sitaxsentan, avec cependant l'apparition plus fréquente d'œdème <sup>232</sup>.

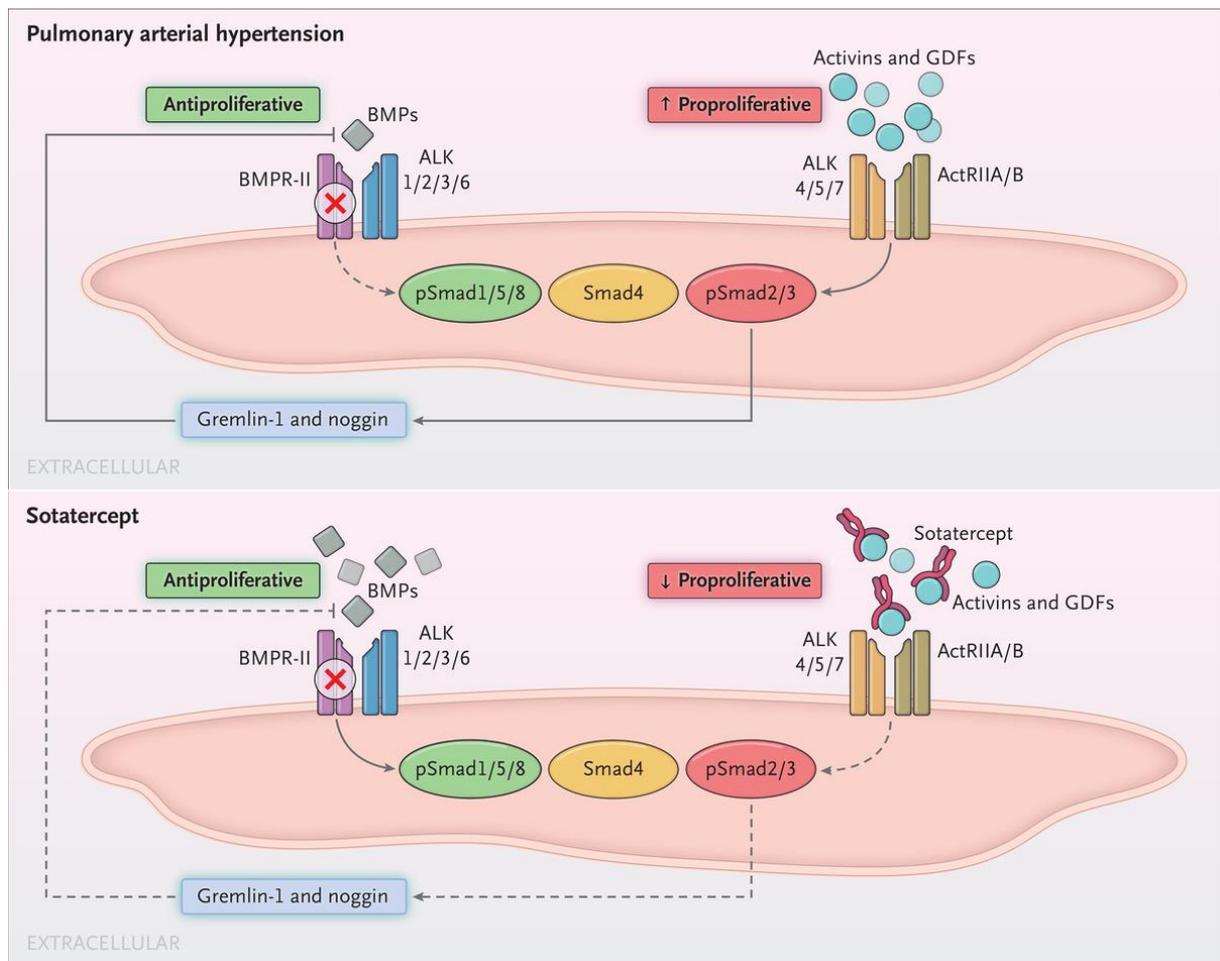
Les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 sont des médicaments utilisables par voie orale.

- Inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (PDE5)

L'inhibition de la PDE5 est à l'origine d'une augmentation de la concentration intracellulaire de GMP cyclique avec pour conséquence une relaxation du muscle lisse vasculaire pulmonaire et une inhibition de la prolifération des CML. Ces médicaments présentent l'avantage d'une administration par voie orale et de l'absence d'effets secondaires hépatiques<sup>233</sup>.

- Modulateurs de la voie BMP

Récemment, un essai clinique porté sur 106 patients HTAP recevant déjà un traitement de fond pour l'HTAP, a démontré l'efficacité du médicament Sotatercept contre l'HTAP familiale et idiopathique. Sotatercept est une protéine de fusion entre la partie extracellulaire du récepteur de l'activine de type IIA (ActRIIA) et un fragment d'une immunoglobuline IgG1. Ce médicament agit comme un piège séquestrant les ligands d'ActRIIA permettant de restaurer l'équilibre entre la voie inhibitrice de la prolifération des BMPs et la voie pro-proliférative du TGF- $\beta$ <sup>234</sup> (Figure 33).



**Figure 33 : Proposition du mécanisme d'action du sotatercept dans l'HTAP**

Les mécanismes d'action de sotatercept influent sur le déséquilibre de la voie inhibitrice des BMPs et la voie pro-proliférative du TGF- $\beta$ . L'HTAP est associée à une dérégulation de la voie du récepteur de type II des BMP (BMPRII) associé au SMAD1/5/8 dans les cellules musculaires lisses et cellules endothéliales. La baisse d'activité de la voie BMPRII-SMAD1/5/8 conduit à l'augmentation de la production de ligand comme l'activine A ou les facteurs de différenciation 8 et 11 (GDF8 et GDF11) contribuant à la suractivation de la voie de l'activine-récepteur de type IIA (ActRIIA) associé au SMAD2/3. L'augmentation de la prolifération des SMAD2/3 favorise l'expression de l'antagoniste endogène gremlin-1 et noggin. Ces mécanismes aboutissent à une réduction de la voie antiproliférative tout en augmentant la voie pro-proliférative. En piégeant les ligands de ActRIIA, Sotatercept diminue la voie ActRIIA-SMAD2/3 (issue de <sup>234</sup>)

Après 24 semaines de traitement sous sotatercept, les patients HTAP présentent des résistances vasculaires pulmonaires significativement diminuées par rapport aux patients HTAP traités avec le placebo. De plus, ces patients ont une meilleure capacité à l'effort (test de marche de six minutes) ainsi qu'une amélioration de différents biomarqueurs de la fonction cardiaque<sup>234</sup>. D'une part, cette étude représente un espoir pour l'émergence d'un traitement curatif de l'HTAP ; d'autre part, elle apporte des précisions sur les mécanismes physiopathologiques liés à BMPRII dans l'HTAP (détaillés dans la partie 3.3.a de ce

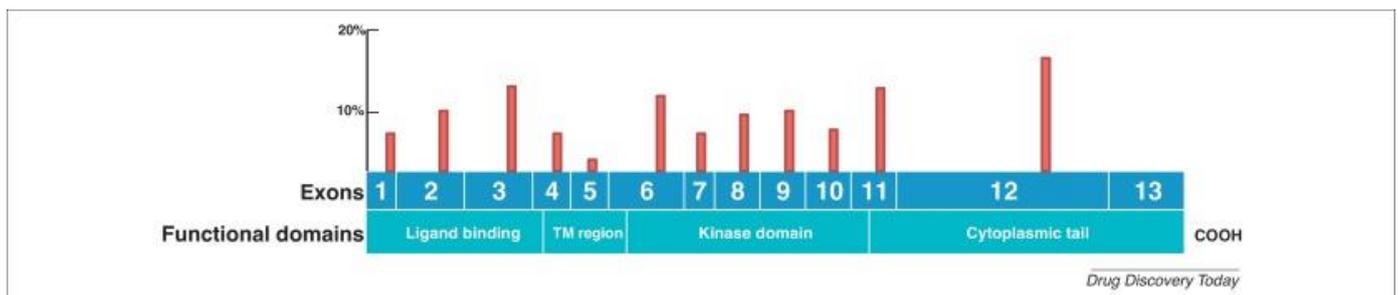
chapitre).Malgré les avancées dans la prise en charge des patients atteints de l'HTAP, les traitements actuels ne permettent pas de guérir de cette maladie grave mais ils constituent des traitements symptomatiques qui ont considérablement amélioré la survie des patients (60% de survie à 5 ans) et leur qualité de vie. Leurs effets tendent à diminuer au cours de l'évolution, obligeant à recourir à la transplantation pulmonaire.

## 3.2. Génétique de l'HTAP

La description de formes familiales d'hypertension artérielle pulmonaire a été à l'origine de l'identification des facteurs génétiques expliquant ainsi la prédisposition génétique à la maladie. L'exploration génétique de l'HTAP fait aujourd'hui partie intégrante de l'investigation de cette maladie depuis l'identification d'un gène majeur : le gène *BMPR2*. D'autres gènes ont cependant aussi été identifiés et sont responsables d'HTAP, soit dans le cadre de maladies génétiques (formes syndromiques), soit dans le cadre d'HTAP isolé (formes non syndromiques).

### a) Mutation *BMPR2*

Grâce à l'étude des familles atteints d'HTAP, le gène *BMPR2* a été identifié comme le gène majeur de prédisposition à l'HTAP<sup>235</sup>. Le modèle de transmission génétique est de type dominant avec pénétrance incomplète. Ainsi des mutations du gène *BMPR2* sont retrouvées dans 70% des formes familiales ainsi que dans 15-20% des formes sporadiques dites idiopathiques<sup>236</sup>. La pénétrance de ces mutations semble dépendante de l'âge et du sexe du patient (la pénétrance est estimée à 42% chez les femmes et 14% chez les hommes)<sup>216</sup>. Les mutations du gène *BMPR2* observées au cours de l'HTAP sont de différents types, selon le domaine ou elles sont situées. Elles peuvent être de tout type, entraînant un stop codon prématuré (insertion-délétion, codon stop prématuré) dans les différents domaines du récepteur<sup>237</sup> (Figure 34).



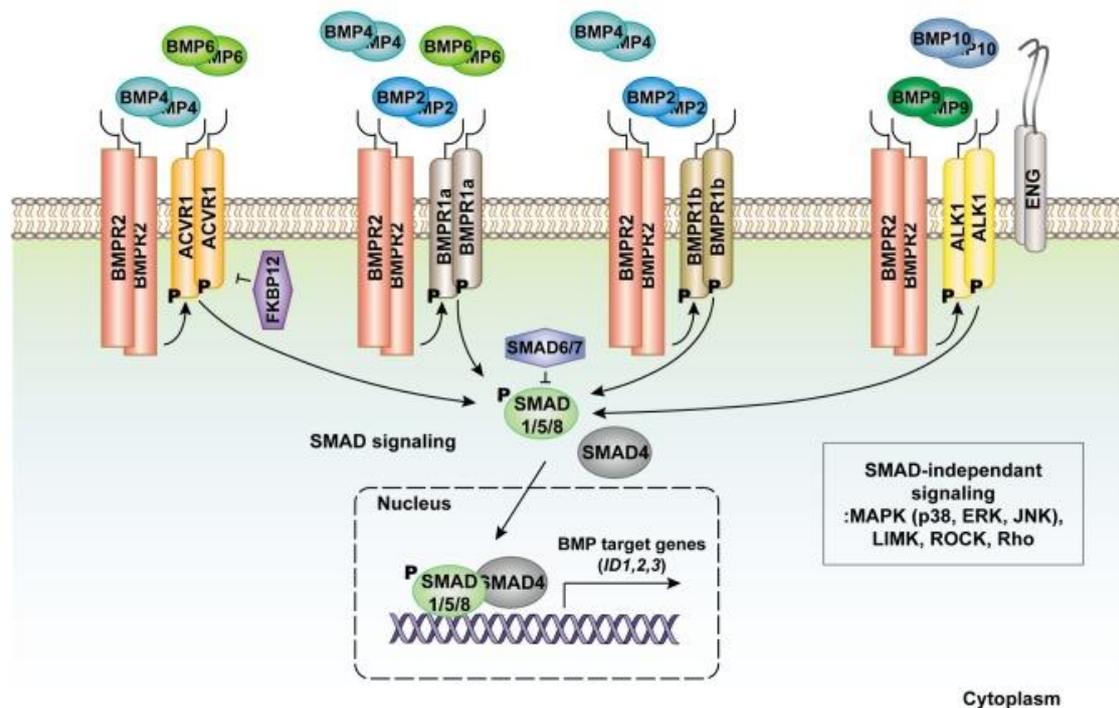
**Figure 34 : Les mutations *BMPR2* associées à l'HTAP**

Les barres de mesure rouges représentent les différentes catégories de mutation et leur occurrence relative dans l'exon. TM region : Transmembrane region (issue de <sup>237</sup>)

Dans tous les cas, ces mutations entraînent des pertes de fonction de l'allèle à l'état hétérozygote. La perte de fonction d'un seul allèle suffit à entraîner une susceptibilité à la maladie. La perte de fonction des deux allèles est non viable<sup>238</sup>.

- Voie de signalisation BMPR2

Le gène BMPR2 code pour un récepteur membranaire de la superfamille du TGF- $\beta$ . La famille de ces récepteurs se divise en deux catégories : les sept récepteurs de type I (ALK1-7) et les quatre récepteurs de type II : BMPRII, ACVR2a, ACVR2b et TGF $\beta$ R1. Les récepteurs de type II forment un complexe avec un récepteur de type I en présence du ligand. La famille des 20 BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) sont des ligands de ces récepteurs. Ces derniers sont divisés en quatre groupes : BMP2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10 et BMP12/13/14. Chaque ligand possède une affinité plus ou moins importante avec les différents récepteurs (Figure 35). En présence du ligand, BMPRII phosphoryle le récepteur de type I qui va assurer la transmission du signal intra-cellulaire par phosphorylation des récepteurs SMAD 1, 5 et 8. Le complexe SMAD1/5/8 phosphorylé migre vers le noyau en étant associés avec une navette commune au SMAD, le co-SMAD4. Dans le noyau, les SMAD induisent un signal transcriptionnel. La voie de signalisation passe aussi par la phosphorylation des MAP-kinases, p38 et Erk1/2 de façon indépendante des SMAD<sup>239</sup>. La complexité de la voie de signalisation BMP est augmentée par la multiplicité des ligands, par les inhibiteurs de la voie et par les différents types de phosphorylation des SMAD qui modulent leur activité.



**Figure 35 : Schéma de la voie de signalisation de BMPR2**

Schématisation des liaisons entre les ligands et les récepteurs BMPR2 associés aux différents récepteurs de type 1 (ACVR1, BMPR1a, BMPR1b et ALK1). Les ligands BMP4 et BMP6 se lient au complexe BMPR2-ACVR1 ; BMP2, BMP4 et BMP6 se lient au complexe BMPR2 et BMPR1a ; BMP2 et BMP4 se lient au complexe BMPR2 et BMPR1b ; et BMP9 et BMP10 se lient à BMPR2-ALK1. L'activité d'ACVR1 est inhibée par son interaction avec FKBP12. L'endogline (EGN), un corécepteur d'ALK1, favorise la formation de ce complexe. La liaison des ligands avec les récepteurs entraîne la phosphorylation des SMAD1/5/8 qui se lie à SMAD4. Ce complexe SMAD transloque vers le noyau et induit l'expression de gènes cibles. Il existe une boucle de rétroaction grâce aux SMAD6 et SMAD7 qui inhibe la voie de signalisation en se liant aux récepteurs de type 1. Les protéines MAPK, LIMK, ROCK, et Rho sont activées indépendamment de la voie SMAD (issue de <sup>240</sup>)

De nombreux gènes cibles de la voie BMP jouent un rôle dans la différenciation cellulaire lors de l'embryogenèse<sup>241</sup>, en particulier lors du développement vasculaire<sup>242</sup>. En effet, de nombreuses études ont démontré l'importance de la voie BMP dans la croissance, la différenciation et l'apoptose des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires<sup>243-246</sup>.

- Caractéristiques de l'HTAP associé à une mutation du gène BMPR2

Chez les patients ayant une mutation délétère de BMPR2, la maladie est diagnostiquée en moyenne environ dix ans plus tôt que les sujets non mutés. Les signes hémodynamiques sont plus sévères dans les formes avec mutation que sans mutation. Le taux de survie est identique mais l'âge du décès est significativement plus jeune<sup>247</sup>. Les mutations BMPR2 semblent donc favoriser le déclenchement de la maladie de façon plus précoce. Les mécanismes expliquant pourquoi les porteurs de la mutation BMPR2 déclenchent l'HTAP ne sont pas encore totalement élucidés. Un ensemble d'études *in vitro* ont montré que la plupart des mutations BMPR2 retrouvées chez les patients HTAP conduisent à une déficience du signal SMAD et ainsi une baisse d'activité de la voie BMP<sup>248</sup>.

L'hypothèse principale est que l'altération de la voie BMP conduit à la suractivation de la voie TGF- $\beta$  aboutissant à une prolifération des CML et des cellules endothéliales dans les artérioles. L'activation de la voie BMP inhibant la prolifération des CML renforce cette hypothèse<sup>249-251</sup>. Le mécanisme proposé est le suivant : la baisse d'activité de la voie BMPRII-SMAD1/5/8 conduit à l'augmentation de la production des ligands activines, comme l'activine A, ou les facteurs de différenciation, comme GDF8 et GDF11, contribuant à la suractivation de la voie du récepteur de l'activine de type IIA (ActRIIA) associée au SMAD2/3<sup>252-254</sup>. L'augmentation de la prolifération des SMAD2/3 favorise l'expression des antagonistes endogènes des BMPs gremlin-1 et noggin<sup>255</sup>. Ces mécanismes aboutissent à une réduction de la voie antiproliférative tout en augmentant la voie pro-proliférative. Etant donné que la voie de signalisation BMPRII est aussi impliquée dans le développement des patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>256</sup>, ce déséquilibre de la voie antiproliférative BMPRII-SMAD1/5/8 et de la voie pro-proliférative TGF- $\beta$  semblent être un mécanisme physiopathologique central dans le développement du remodelage artériel observé dans l'HTAP.

## b) Les autres gènes de la voie BMP

Bien que moins fréquentes que la mutation BMPR2, d'autres mutations de gènes impliqués dans la voie de signalisation BMP ont été identifiées. C'est le cas de la mutation du gène ACVRL1 et ENG. Les mutations du gène ACVRL1 et du gène ENG sont associées au

développement de la maladie de Rendu-Osler ou télangiectasie héréditaire<sup>257</sup>. Des études ont rapporté que l'HTAP est une complication rare mais très sévère de cette maladie<sup>258</sup>. Dans ce cas, la mutation en cause est le gène ACVRL1 codant pour le récepteur ALK1. Ce dernier est un récepteur de type 1 qui, associé au BMP9, régule la voie de signalisation des BMP dans les cellules endothéliales<sup>259</sup>. En criblant les différents gènes candidats de la voie BMP, des équipes ont identifié des mutations du gène SMAD8 (ou SMAD9) ainsi que le gène GDF2 (codant pour le ligand BMP9) comme de potentiels nouveaux gènes de l'HTAP familiale<sup>260</sup>. La découverte de ces gènes renforce l'importance de la voie BMPR2 dans la physiopathologie de l'HTAP.

Les variants du gène CAV1, codant pour la cavéoline impliquée dans la voie du TGF- $\beta$ , ont été retrouvés chez des patients atteints de lipodystrophie associée à une HTAP ainsi que chez des patients diagnostiqués HTAP de forme idiopathique et héritable<sup>261</sup>. Il a été montré qu'une mutation du gène CAV1 entraînant un changement des 20 acides aminés C-terminaux, conduisait à la baisse de fonction antiproliférative de cavéoline 1<sup>262</sup>.

### c) Les autres gènes en dehors de la voie BMP

La voie BMPR2 ne semble pas la seule voie impliquée dans le développement de l'HTAP.

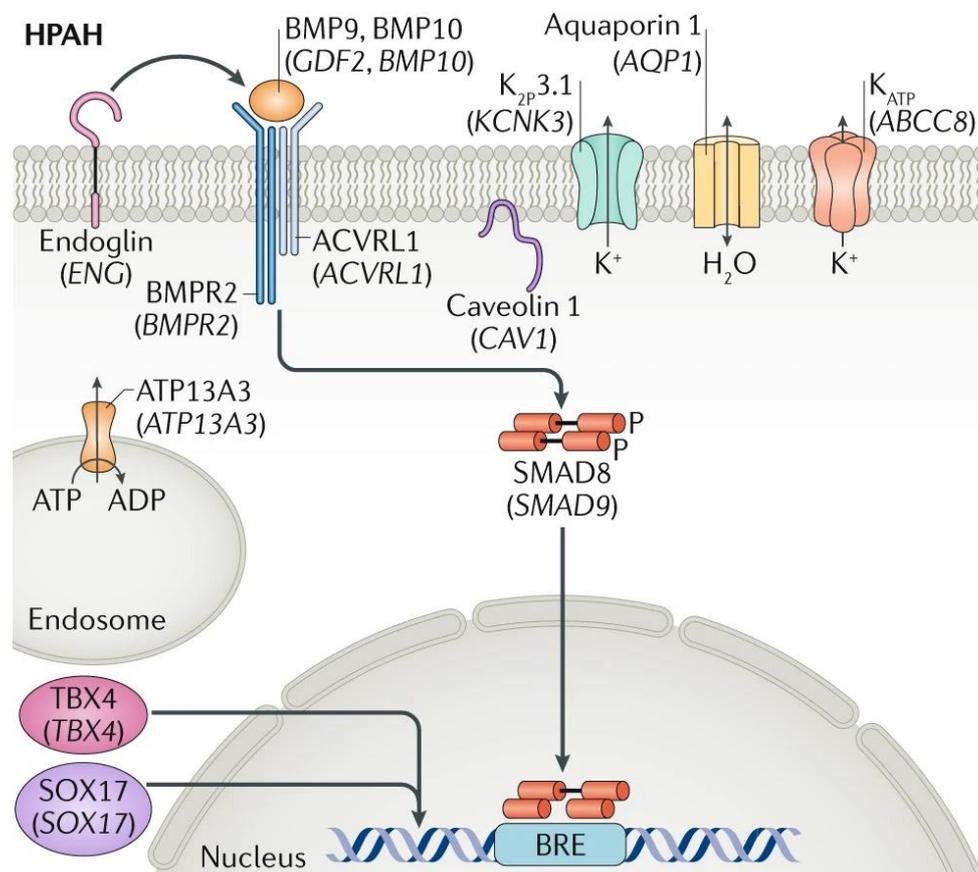
Par exemple, l'identification des mutations du gène KCNK3 a mis en évidence le rôle pathologique du dérèglement du courant potassique, en particulier dans les cellules musculaires lisses, dans l'HTAP<sup>263,264</sup>. La voie de l'angiogenèse est particulièrement étudiée à travers les récepteurs du VEGFA. Chez des patients HTAP, Eyries et coll ont récemment identifié des mutations dans le gène KDR, codant pour le récepteur 2 au VEGFA : VEGFR2<sup>265</sup>. L'activation de ce récepteur dans les cellules endothéliales initie l'angiogenèse tout en favorisant la prolifération, la survie et la migration cellulaire<sup>266</sup>. L'inhibition de VEGFR2 par l'injection du SU5416 (également connu sous le nom de sugen ou semaxanib) en combinaison d'une hypoxie, déclenche une hypertension pulmonaire chez le rat<sup>267</sup>. Les mécanismes physiopathologiques mis en place dans ce modèle de rat peuvent donc être similaires à ceux des patients mutés pour le gène KDR.

Graf et coll ont mis en évidence la présence de variants hétérozygotes des gènes ATP13A3, AQP1 et SOX17 dans une cohorte de patients HTAP<sup>268</sup>. La mutation de ATP13A3 perturbe les échanges des canaux ioniques tandis que les mutations des gènes AQP1 et SOX17 altèrent la production de la  $\beta$ -caténine<sup>269-271</sup>. Cependant, des études préliminaires suggèrent que la

mutation ATP13A3 diminue la prolifération des cellules endothéliales tout en favorisant la résistance à l'apoptose et que la mutation du gène AQP1 intervient dans l'angiogénèse<sup>270,272</sup>.

Une étude portée sur 256 patients a montré que la mutation SOX17 est présente chez 3,2% de patients atteints d'HTAP, associés aux maladies cardiaques congénitales et 0,7% de patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>273</sup>. En interaction avec la voie NOTCH, la protéine SOX17 est impliquée dans l'embryogénèse<sup>274</sup>. Comme ATP13A3 et AQP1, les mécanismes de l'HTAP liés à la mutation SOX17 ne sont pas encore compris.

Enfin, la mutation du gène TBX4 a initialement été identifiée chez des enfants atteints d'HTAP<sup>275</sup>. Une étude portant sur 155 enfants et 257 adultes atteints d'HTAP a identifié la présence majoritaire d'une mutation sur le gène TBX4 dans la cohorte des enfants HTAP par rapport à la cohorte des adultes HTAP<sup>276</sup>. Les enfants porteurs d'une mutation du gène TBX4 développeront une HTAP sévère et plus précoce que les patients porteurs de la mutation BMPR2<sup>277</sup>. TBX4 possède un rôle important dans l'embryogénèse<sup>278</sup>; son lien avec le déclenchement de l'HTAP reste à déterminer.



**Figure 36 : Gène de prédisposition de l'HTAP familiale**

Plusieurs variants génétiques associés à l'HTAP familiale sont impliqués dans la voie BMP : BMPR2, ACVRL1, ENG, SMAD4, SMAD9 et CAV1. KCNK3 code pour une protéine du courant potassique. La protéine ATP13A1 est présente dans le compartiment endosomal de la cellule. SOX17 et TBX4 codent pour des facteurs de transcription (issue de <sup>279</sup>)

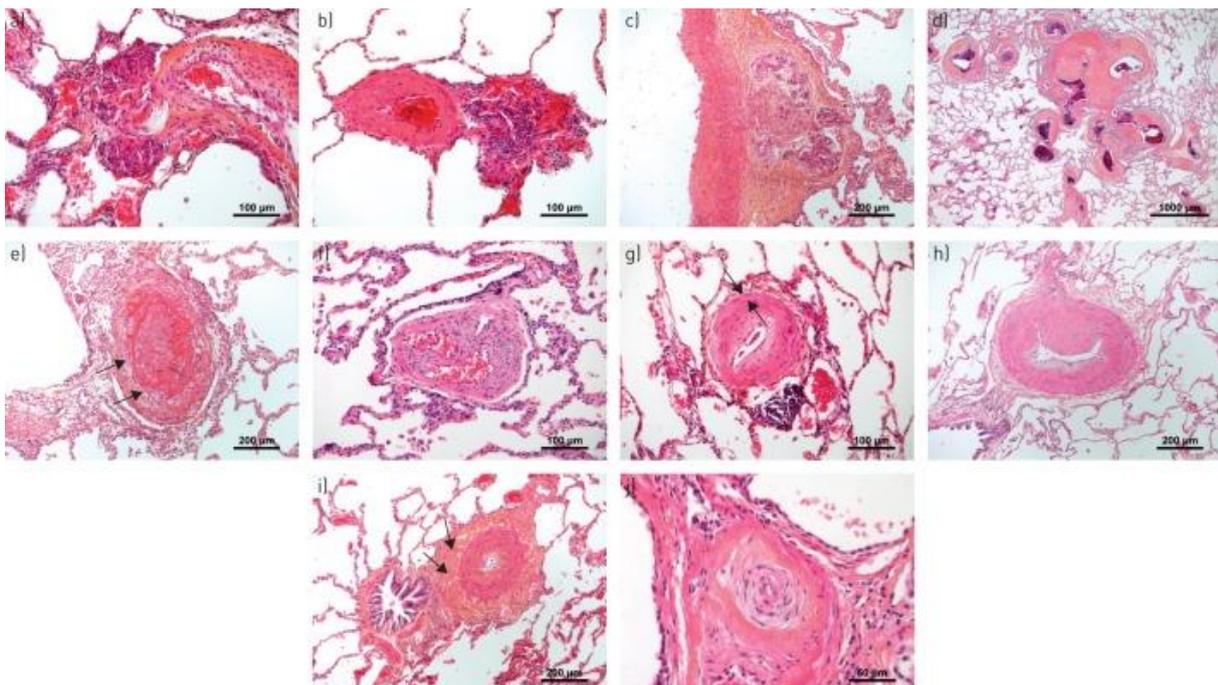
Plusieurs gènes sont reconnus à l'origine d'une prédisposition à l'HTAP. Leurs mécanismes convergent pour favoriser une perte partielle de l'activité BMP et une suractivation de la voie pro-proliférative de la voie TGF $\beta$ . Cependant, des voies liées à l'angiogénèse, l'embryogénèse et aux canaux potassiques, semblent aussi jouer un rôle dans la pathogénèse de l'HTAP. Même si plusieurs mécanismes physiopathologiques restent à élucider, l'identification de ces différentes mutations représente une belle avancée pour le diagnostic de l'HTAP.

### 3.3. Physiopathologie de l'HTAP

#### a) Anatomopathologie de l'HTAP

Dans l'HTAP, les lésions vasculaires sont majoritairement artérielles. Les artères, entre 70 $\mu$ m et 500 $\mu$ m de diamètre, ainsi que les artéριοles, entre 20 $\mu$ m et 70 $\mu$ m, sont obstruées par une muscularisation anormale et une inflammation non contrôlée. L'HTAP est caractérisée par des lésions et des anomalies structurelles telles que :

- Les lésions plexiformes. Du fait d'une prolifération des cellules endothéliales, myofibroblastes et cellules musculaires lisses (CML), ces lésions s'organisent en canaux microvasculaires endoluminaux dans une matrice oblitérante riche en collagène<sup>280</sup> (Figure 37a-c).
- Les lésions intimales. Une accumulation de myofibroblastes, de matrice extracellulaire et d'infiltrat inflammatoire forme une couche supplémentaire entre l'endothélium et l'élastique interne artériel. Ces lésions peuvent être excentriques ou concentriques<sup>281</sup> (Figure 37g-h)
- Hypertrophie de la media. La prolifération et la résistance à l'apoptose des CML pulmonaires induit un épaissement de la média des artères pulmonaires<sup>281</sup> (Figure 37i)



### Figure 37 : Caractéristiques histologique de l'HTAP

a-c) Lésions plexiformes ; d) Lésions fibrovasculaires atypiques principalement retrouvées chez les formes BMPR2 mutées ; e-f) Thrombose ; g) Fibrose intimale concentrique non laminaire h) fibrose intimale excentrique i) hypertrophie de la média j) Fibrose intimale concentrique avec un aspect en «bulbe d'oignon » (issue de <sup>281</sup>)

L'HTAP se caractérise par la vasoconstriction, le remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaires et la thrombose. Ces processus contribuent à la rigidification et à l'obstruction des artères pulmonaires conduisant à une augmentation des résistances à l'écoulement du sang.

### b) Pathogénèse de l'HTAP

L'HTAP recouvre une physiopathologie multifactorielle dans laquelle plusieurs gènes assurant des fonctions différentes ont été repérés comme étant à l'origine d'une prédisposition génétique à l'HTAP. Cependant, les recherches sur cette maladie ont pu mettre en évidence des mécanismes pathologiques communs aux différentes forme d'HTAP. Ceux-ci sont guidés par l'interaction complexe entre les différentes populations cellulaires présentes dans la paroi vasculaire, la suractivation de la réponse inflammatoire et immunitaire ainsi que la dérégulation de la matrice extracellulaire (Figure 38).

## GENE-ENVIRONMENT INTERACTIONS

- *BMPR2* and other mutations
- Impaired *BMPR-II* signaling
- SNPs of: *SERT*, *Kv1.5*, and *TRPC6*
- Epigenetic (*DNMT*, *HDAC*, *MIRNA*)
- Sex hormone imbalance

### Environmental triggers:

- Anorexigens
- Amphetamines
- HIV
- Schistosomiasis

### BLOOD

- Platelets
- Th2
- Treg
- Macrophages
- NK cells



- ↑ Platelet activation and serotonin release
- ET-1/TxA2/NO+PGI2
- Adrenomedullin/BNP
- Autoantibodies, growth factors
- Cytokines (IL-6, MCP-1), NFkB

### INTIMA ENDOTHELIUM



- ↓ VIP, NO+PGI2, PPAR

- ↑ Tissue factor, ADMA
- VIP receptors, PDGFR
- PKM2

- ↑ Warburg metabolism
- Thrombosis
- Constrictors/dilatators
- Proliferation/apoptosis

### MEDIA SMOOTH MUSCLE CELLS



- ↓ Kv1.5/2.1, PPAR, ApoE
- Mitofusin2 (mitochondrial fusion)
- MCUC function (mitochondrial Ca<sup>2+</sup>)
- SOD2/PDH activity

- ↑ Drp1 (fission)
- HIF-1α, NFAT, and PDK
- Survivin, S-HHT, PDGF
- Rho kinase, TRPC-6
- Phosphodiesterase 5

- ↑ Warburg metabolism
- Mitochondrial fission
- Depolarized, Ca<sup>2+</sup> overloaded, Ca<sup>2+</sup> sensitized proliferation/migration/apoptosis resistance

### ADVENTITIA FIBROBLASTS

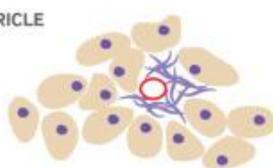
- Collagen
- Elastin



- ↑ PKM2
- Elastase/MMP/tenascin
- Inflammation (IL-6, MCP-1, NFkB)
- Progenitor cells (+/-)
- Proliferating fibroblasts
- Adipocytokine: TNF-α, IL-6 (↓ APN)

- ↑ Warburg metabolism drives fibroblast proliferation/migration and inflammatory cell influx
- Elastin fragmentation

### RIGHT VENTRICLE



- ↓ Blood supply (ischemia/hibernation)
- SERCA2A
- Junctophilin 2

- ↑ Mitochondrial fission
- Glycolysis
- Adrenergic activation, fibrosis

- ↑ Warburg metabolism
- T-tubule disarray
- Fibrosis

- ↓ Contractility

**Figure 38 : Mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP.**

Toutes les couches de la paroi vasculaire sont impliquées dans le développement de l'HTAP. L'état basal est représenté à gauche de la figure, les anomalies liées à l'HTAP sont soulignées au centre de la figure et les conséquences sont détaillées à droite de la figure. Les effets principaux de ces anomalies sont : la vasoconstriction, l'inflammation, la thrombose ainsi qu'une population de cellules endothéliales prolifératives et résistantes à l'apoptose favorisant la vasoconstriction et une fibrose excessive. Ce remodelage vasculaire augmente les résistances pulmonaires et conduit à une insuffisance cardiaque droite (issue de <sup>282</sup>)

- Dysfonction endothéliale

Les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes jouent un rôle dans l'initiation et/ou l'évolution des lésions artérielles pulmonaires caractéristiques de l'HTAP.

Les CML sont les acteurs principaux de la néo-muscularisation des artères pulmonaires tandis que les myofibroblastes participent au remodelage de l'intima. La prolifération des cellules endothéliales conduit à la formation de lésions plexiformes<sup>283</sup>. Les mécanismes provoquant la muscularisation et cette prolifération anormale, demeurent inconnus.

Cependant, les cellules endothéliales sont soupçonnées d'être la source principale de médiateurs favorisant le remodelage vasculaire tels que les facteurs de croissance (FGF-2, la sérotonine-5 ou l'angiotensine II), les peptides vasoactifs (NO, PGI2 et ET1), les cytokines (IL6 et IL1), les chimiokines (MCP-1) et enfin les adipokines (leptine)<sup>284-290</sup>. Dans l'HTAP, cette surproduction paracrine de médiateurs est associée à une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction endothéliale entraîne un déséquilibre vasodilatation/vasoconstriction. La surexpression de l'ET-1, une synthèse diminuée du NO et de la prostacycline de l'endothélium des patients HTAP, contribuent à la composante vasoactive de l'HTAP<sup>291-293</sup>. Or la plupart des stimuli qui augmentent fortement la vasoconstriction, provoquent également une prolifération cellulaire et jouent donc un rôle probable dans le remodelage artériel pulmonaire.

Les cellules endothéliales présentes dans les lésions vasculaires de l'HTAP présentent un phénotype pro-prolifératif et résistant à l'apoptose<sup>294</sup>. Dans les lésions plexiformes, les cellules endothéliales expriment les marqueurs de la prolifération (KI67/MIB1), de l'angiogenèse et de la survie cellulaire (VEGF, VEGFR, HIF-1a et 1B)<sup>295,296</sup>.

Chez les porteurs de la mutation BMPR2, cet état prolifératif semble être lié à la baisse d'activité de BMP et ainsi la suractivation de la voie pro-proliférative du TGFB (voir partie 3.2.a). La pénétrance de la mutation étant incomplète, il est possible qu'un second facteur environnemental et/ou génétique soit à l'origine de la prolifération endothéliale au cours des HTAP idiopathiques. Des équipes ont suggéré que la prolifération des cellules endothéliales pouvait être liée au recrutement des cellules progénitrices<sup>297</sup>. En effet, certains médiateurs sécrétés lors d'une dysfonction endothéliale, comme l'IL6 et FGF2, sont à l'origine du recrutement et de la différenciation des péricytes pulmonaires<sup>298</sup>.

Chez le rat, il a été montré que l'association du blocage chronique de VEGFR2 et de l'hypoxie chronique pouvait causer une dysfonction cellulaire endothéliale et une mort cellulaire permettant de sélectionner un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose parmi les cellules endothéliales. La sélection de cellules endothéliales ayant un phénotype résistant à l'apoptose pourrait être essentielle à la prolifération des cellules endothéliales des artères pulmonaires<sup>299,300</sup>. La diminution d'expression de la caspase 3 clivée et de PPAR $\gamma$  (deux protéines liées aux processus antiprolifératifs et pro-apoptotiques) est observée dans les cellules endothéliales présentes dans les lésions plexiformes des patients HTAP et renforce cette hypothèse<sup>294,301</sup>.

Une hyperactivation du facteur de transcription STAT3 a été reportée dans le modèle HTAP du rat monocrotaline<sup>302</sup>. Ce facteur de transcription possède un rôle important dans la prolifération endothéliale<sup>303</sup>. Etant donné qu'une augmentation de la phosphorylation de STAT3 est retrouvée chez les patients atteints d'HTAP idiopathique ou familiale<sup>294,304</sup>, les mécanismes associés à cette sélection de cellules endothéliales prolifératives et résistantes à l'apoptose semblent liés à l'activation du facteur de transcription STAT3.

Enfin, la dysfonction endothéliale peut être associée à une communication aberrante entre les cellules endothéliales et les autres cellules de la paroi vasculaire. Certains médiateurs comme FGF2, la sérotonine, PDGF et EGF favorisent la contraction, la prolifération et la survie cellulaire des CML des artères pulmonaire<sup>305,306</sup>. L'augmentation de la transition endothelio-mésenchymateuse (endoMT) est aussi observée chez les patients HTAP ajoutant des précisions au modèle de développement des lésions vasculaires artérielles de l'HTAP<sup>307</sup>.

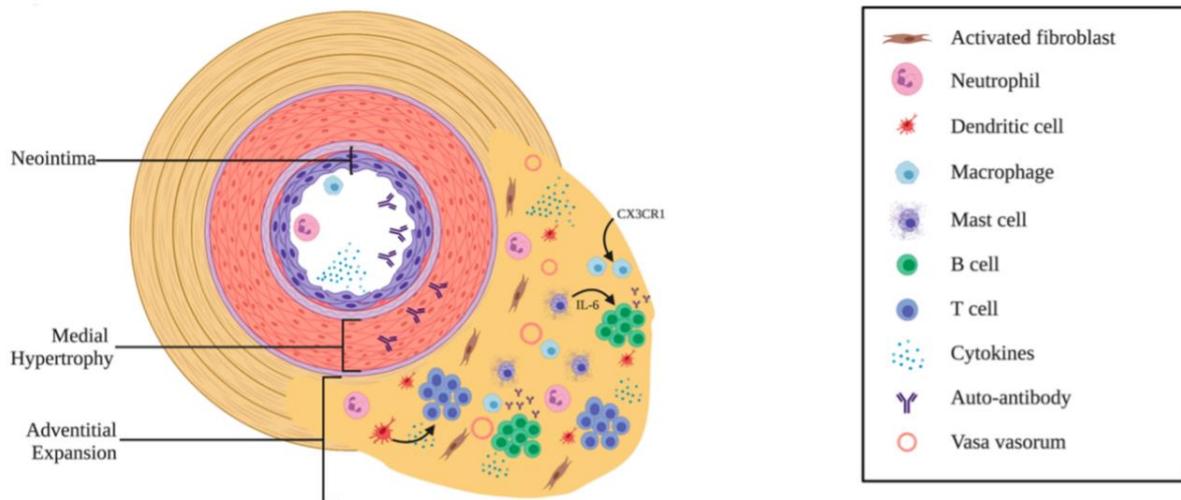
- L'inflammation

Des études ont montré l'importance de l'inflammation dans la progression pathologique de l'HTAP. Tout d'abord, les études histologiques des patients HTAP confirment la présence d'infiltrats inflammatoires périvasculaires autour des vaisseaux remodelés incluant les lésions plexiformes. Ces infiltrats sont essentiellement composés de macrophages, de mastocytes, de monocytes et de lymphocytes T (Figure 39)<sup>308</sup>.

Des cellules dendritiques ont aussi été retrouvées dans l'adventice et la média d'artères pulmonaires humaines de patients atteints d'HTAP<sup>309</sup>. Les rôles des lymphocytes NK, des

macrophages et des neutrophiles dans l'HTAP sont particulièrement étudiés pour leurs potentielles implications dans le remodelage vasculaire. Les cellules NK isolées des patients HTAP possèdent un phénotype anormal (réponse accrue au TGF- $\beta$ , diminution des récepteurs aux immunoglobulines, baisse de production de MMP9) et favorisent l'immunité adaptative pathologique<sup>310</sup>. Les macrophages s'accumulent autour des lésions périvasculaires retrouvées chez les patients HTAP<sup>311</sup>. Cependant, il semblerait que le type et la localisation des macrophages soit un facteur particulièrement important. En effet, une atténuation de l'élévation des pressions artérielles pulmonaires est observée chez des rats exposés à l'hypoxie, lors d'une déplétion intratrachéale de macrophages mais pas lors d'une déplétion intrapéritonéale de macrophages<sup>312</sup>. Des chercheurs ont ainsi émis l'hypothèse que, dans le développement de l'HTAP, le phénotype des macrophages évolue au cours du temps.

Enfin, les neutrophiles sont une population de cellules inflammatoires dont l'implication dans l'HTAP a longtemps été négligée. Pourtant, des études récentes ont montré l'élévation du niveau de myéloperoxydase (MPO) et d'élastase neutrophile (EN), deux protéines exprimées par les neutrophiles, dans le plasma des patients atteints HP<sup>313</sup>. De plus, l'injection d'inhibiteur d'EN atténue le remodelage vasculaire observé dans le modèle de rat HTAP injecté à la monocrotaline<sup>314</sup>. Il semblerait que les neutrophiles participent au remodelage vasculaire à travers la nétose, processus qui libère des fibres composées d'ADN et de protéines, et dont la fonction est de piéger des micro-organismes pathogènes. La nétose a été observée dans les lésions plexiformes des patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>315</sup>.



**Figure 39 : Cellules inflammatoires impliquées dans l'HTAP**

L'activation de ces cellules immunitaires conduit au recrutement de médiateurs cellulaires comme la sécrétion de cytokines, d'anticorps et de protéine cytotoxiques (issue de <sup>316</sup>)

Des follicules lymphoïdes tertiaires, connectés aux vaisseaux lymphatiques, ont été identifiés à proximité d'artères pulmonaires remodelées<sup>317</sup>. De plus, la présence d'auto-anticorps circulants (anticorps anti-nucléaire, anti-fibroblaste, anti-cellule endothéliale), présents chez 10% à 40% des patients atteints d'HTAP idiopathique, traduit l'implication possible d'une auto-immunité dans la physiopathologie de l'HTAP<sup>318,319</sup>.

Les patients HTAP présentent une augmentation des cytokines circulantes (IL1- $\beta$ , IL6 et IL8)<sup>320,321</sup> et des chimiokines (CCL2/MCP-1, RANTES et CX3CL1)<sup>322-324</sup>. Ces médiateurs inflammatoires sont le signe d'une inflammation chronique et peuvent être utilisés comme biomarqueur pronostique, comme l'IL6 dont le niveau de production est corrélé à la durée de survie des patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>321</sup>. En plus de leur rôle pro-inflammatoire, ces molécules peuvent aussi participer au remodelage vasculaire. En effet, des études montrent l'implication de l'IL1- $\beta$  dans la prolifération des CML via la voie IL1R1/MYD88 tandis que l'IL6 participe à leur résistance à l'apoptose<sup>325,326</sup>.

Aujourd'hui, il est encore difficile de savoir si l'inflammation est une cause ou une conséquence de l'HTAP. En effet, l'infection, les médicaments ou les toxines peuvent être des facteurs déclenchant l'HTAP, en particulier dans la forme héritable puisque la pénétrance de la mutation BMPRII est incomplète. Malgré les zones d'ombre sur son mécanisme d'activation, l'inflammation reste un processus central au développement de l'HTAP

# Hypothèse de l'étude

---



De nombreuses incertitudes demeurent quant aux mécanismes physiopathologiques de la maladie veino-occlusive pulmonaire. L'identification du variant génétique *EIF2AK4* responsable de la forme héréditaire de la maladie a cependant ouvert de nouvelles pistes pour la compréhension de cette maladie. En effet, la forme héréditaire est transmise de façon autosomique récessive par mutations bialléliques du gène *EIF2AK4* invalidant la fonction du gène. La pénétrance de la maladie est très élevée et elle survient depuis la naissance jusqu'à l'adulte jeune. Etant donné que les patients atteints de MVOP héréditaire déclenchent la maladie à des âges très différents, il est supposé qu'un facteur supplémentaire, d'origine environnementale, génétique ou épigénétique, soit responsable du déclenchement de la maladie. Au vu du rôle essentiel de GCN2 dans la réponse au manque en acides aminés, cette kinase est le plus souvent étudiée dans les organes liés au métabolisme comme le foie ou l'intestin. Ainsi, peu de données ont été publiées sur le rôle de GCN2 au niveau pulmonaire. Notre premier objectif a donc été d'explorer, au niveau pulmonaire, les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors d'un stress métabolique chez des animaux ayant une perte de fonction de GCN2.

Pour cela, nous avons créé un modèle de rat unique en invalidant le gène *EIF2AK4* par la technique de CrispR-Cas9 et obtenu plusieurs lignées de rats porteuses de délétions homozygotes de tailles différentes. Contrairement à l'homme, le rat ne déclenche pas la MVOP spontanément. Différents stimuli ont donc été testés afin d'observer des différences physiologiques chez les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* comparés aux rats non mutés appelés *wild-type* (WT). Ainsi, l'injection d'asparaginase (enzyme déplaçant les cellules en asparagine et en glutamine) nous a permis de mettre en place un protocole différenciant les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* des WT par leurs phénotypes. En effet, les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* meurent 6 jours après l'injection contrairement aux WT qui ne montrent aucun effet indésirable notable.

Conscients du délai trop court pour déclencher une maladie pulmonaire telle que la MVOP, nous avons décidé de nous concentrer sur les mécanismes pulmonaires mis en place chez les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* 3 jours après l'induction du stress métabolique. Nous émettons l'hypothèse que ces mécanismes pourraient nous aider à comprendre les mécanismes physiopathologiques de la maladie et ainsi nous donner des indices supplémentaires quant aux facteurs permettant de déclencher la MVOP chez les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>*.

Etant donnée la difficulté rencontrée pour établir un modèle murin de la MVOP, il nous a semblé judicieux d'enrichir notre étude avec des analyses issues de données humaines. En collaboration avec le Centre de Référence de l'hypertension pulmonaire de L'hôpital Bicêtre et de l'hôpital Marie Lannelongue, une analyse du transcriptome par séquençage à haut débit (RNAseq) a été réalisée sur : 4 échantillons de poumons humains atteints de MVOP héréditaire, 4 échantillons de poumons humains atteints d'HTAP idiopathique et 8 échantillons de poumons humains sains. L'objectif de cette étude était d'une part, de comparer les deux maladies MVOP et HTAP et d'autre part, d'élucider les voies majoritaires liées à la perte de fonction de GCN2 chez les patients MVOP.

Même si notre modèle de rat *Gcn2<sup>-/-</sup>* ne déclenche pas de MVOP, il demeurera intéressant de comparer les résultats de nos deux études afin de mettre en exergue les différences potentielles entre les deux espèces avec comme objectif final d'élucider les mécanismes liés à la perte de fonction de GCN2 et de les relier au déclenchement de la MVOP.

# Exposé des travaux

---



# Projet n°1 : Analyse des mécanismes liés à la perte de fonction de GCN2 en réponse à un stress métabolique chez le rat. Liens avec la MVOP

## Introduction

*General control nonderepressible 2* (GCN2) appartient à une famille de quatre kinases :HRI, PERK et PKR qui s'activent en réponse à différents stress cellulaires.

- PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase) est activée par le stress du réticulum endoplasmique
- HRI (Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase) est activée par la carence en hème
- PKR (protein kinase R) est activée par les ARN doubles brins et GCN2 par le manque en acides aminés

En réponse à leurs stress métaboliques respectifs, chacune d'entre elles phosphoryle la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 et déclenche l'*Integrated Stress Response* (ISR). Considérée comme l'une des voies de signalisation les plus importantes de la cellule eucaryote, l'ISR joue un rôle prépondérant dans l'adaptation de la cellule au stress. En effet, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  a pour conséquence l'inhibition de la formation du complexe d'initiation de la traduction, entraînant une forte diminution de la synthèse protéique. Dans ces conditions et grâce à une structure particulière de sa région 5' non traduite, la traduction du messenger du facteur de transcription ATF4 est augmentée. ATF4 peut alors induire la transcription de gènes cibles possédant dans leurs promoteurs des éléments de réponse au stress auxquels la cellule est soumise.

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une forme rare d'hypertension pulmonaire. Cette maladie est caractérisée par des lésions de remodelage prédominant sur les capillaires et veinules. Les patients qui en souffrent décèdent d'une défaillance cardiaque droite. Les mécanismes physiopathologiques de la MVOP sont encore très mal connus. Cependant, notre groupe a réalisé une étude génétique permettant l'identification de mutations bialléliques du gène *EIF2AK4* codant pour la protéine GCN2 chez les patients atteints de MVOP héréditaire. Au vu de son rôle essentiel dans la régulation du métabolisme, GCN2 est particulièrement étudié dans les organes comme le foie ou l'intestin. Cependant, cette récente découverte sous-entend que la perte de fonction de GCN2 peut instaurer des

mécanismes compensatoires au niveau pulmonaire expliquant les lésions observées chez les patients atteints de MVOP héréditaire.

Les souris invalidées pour le gène codant pour GCN2 sont viables et ne présentent pas de phénotype différent de leur littermate de génotype sauvage. Cette observation prouve que l'invalidation seule de la protéine n'est pas suffisante pour déclencher la MVOP chez le murin dans les conditions de laboratoire.

À l'inverse de la souris, la pénétrance de la mutation est quasi complète chez l'humain. L'hétérogénéité dans l'âge du déclenchement de la maladie nous amène à envisager qu'un facteur supplémentaire est nécessaire pour l'induction de la MVOP chez l'humain. Au vu de ces observations, nous avons émis l'hypothèse qu'une meilleure compréhension des différents rôles de GCN2 dans le poumon permettrait de mieux appréhender la maladie et de découvrir quel autre facteur entrerait en jeu pour déclencher la MVOP.

Ainsi, nous avons exploré les différents mécanismes mis en place chez le rat déficient en GCN2, lors d'un stress métabolique induit par l'injection d'asparaginase.

## Méthodes

- Rats

Les animaux  $Gcn2^{-/-}$  sont issus de rats Sprague-Dawley provenant de chez Janvier Lab et modifiés génétiquement au niveau du gène *EIF2AK4* par la plateforme de Nantes (Genocell Edit) grâce à la technique de CrispR-Cas9.

Afin de s'affranchir des effets *off-target* intrinsèques à cette technique, nous avons créé trois lignées de rats invalidées pour le gène *EIF2AK4* par des délétions de tailles différentes : trois lignées de rats  $Gcn2^{-/-}$  avec respectivement une délétion de 25pb, de 41pb et de 150pb.

16 rats mâles et femelles de 8 à 12 semaines (8 rats  $Gcn2^{-/-}$  et 8 rats WT) reçoivent une unique injection d'asparaginase à 75 unités par kilogramme de poids corporel ( $75U/kg^{animal}$ ) en intramusculaire. Afin de recueillir des contrôles négatifs, 16 rats (8 rats  $Gcn2^{-/-}$  et 8 rats WT) reçoivent une dose, en concentration équivalente, de sérum physiologique (NaCl 0,09%).

Nous travaillons avec 4 groupes expérimentaux :  $Gcn2^{-/-}$  ASNase (GA), WT ASNase (WA),  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl (GV), WT Vhcl (WV)

- Analyse et quantification protéique

La technique du Western Blot est une des techniques semi-quantitatives les plus utilisées pour comparer l'expression protéique entre les groupes d'échantillons. Cette technique nous a notamment permis de montrer l'activation de l'ISR grâce à l'augmentation d'expression de la forme phosphorylée et totale de GCN2, ATF4, PERK, Sestrin-2 et l'Asparagine synthétase ainsi que l'activation de l'autophagie par l'expression de LC3B, p62, ATG5 et ATG3 dans le groupe de rats WT traités à l'ASNase.

L'immunofluorescence est une autre technique permettant de détecter ou non la présence d'une protéine tout en indiquant sa localisation dans la cellule ou le tissu analysé. Le double marquage Von Willebrand (vwf ; marqueur cellules endothéliales) et calprotectine (marqueur neutrophiles) nous indique une infiltration périvasculaire des neutrophiles tandis que le double marquage CD3 (marqueur lymphocytes) et Ki67 (marqueur de prolifération) évalue la prolifération des lymphocytes.

La technique ELISA nous a permis de détecter l'augmentation de concentration de la protéine calprotectine dans le sérum des rats  $Gcn2^{-/-}$  traités à l'ASNase.

Enfin, une analyse par cytométrie de flux nous a permis de vérifier la présence d'une population cellulaire caractérisée par le marqueur intracellulaire LAG3 présente uniquement chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl.

- Analyse du transcriptome par RNAseq et qPCR

L'ARN total a été extrait à partir de poumons congelés à l'aide du kit d'extraction mirVANA (Invitrogen), suivi d'un traitement à la DNase. Les bibliothèques d'ADNc ont été construites avec 100 ng d'ARN total et ont été séquencées sur Novaseq 6000 ILLUMINA. La qualité des données brutes a été évaluée avec FastQC.

Les analyses bioinformatiques ont été réalisées avec le logiciel R. La normalisation et l'analyse différentielle avec le package bioconductor DESeq2 nous ont permis de comparer les différences d'expression de gène entre les groupes expérimentaux. Les p-values ajustées, aussi appelées FDR (False Discovery Rate), ont été calculées avec la procédure de Benjamini-Hochberg.

Lors d'une analyse différentielle entre deux groupes expérimentaux, l'expression d'un gène est significative lorsque son FDR est inférieur à 0,05. De plus, un gène est considéré comme régulé à la hausse lorsque le logarithme en base 2 du fold-change est supérieur à 1 et régulé à la baisse quand le logarithme en base 2 du fold-change est inférieur à -1.

Enfin, une analyse d'enrichissement a été réalisée grâce au programme Gene Set Enrichment Analysis, avec la collection Hallmark issue de la base de données Molecular Signatures Data Base (MSigDB). Certains gènes identifiés par RNAseq sont vérifiés par RT-qPCR.

- Analyse des populations cellulaires par Single-cell RNAseq

Pour chaque groupe expérimental, nous avons extrait les cellules pulmonaires de trois animaux de chaque lignée KO :  $Gcn2^{150^{-/-}}$ ,  $Gcn2^{41^{-/-}}$  et  $Gcn2^{25^{-/-}}$ , traités ou non avec l'ASNase. La même extraction a été réalisée avec les littermates de ces rats. Les trois extraits cellulaires ont ensuite été regroupés en une seule population cellulaire par groupe expérimental.

Les cellules viables ont été sélectionnées par tri cellulaire en utilisant Zombie-green (Biolegend).

La préparation des bibliothèques SingleCell a été effectuée avec Chromium de 10X Genomics. 5000 à 20000 cellules ont été chargées sur le chromium et séquencées sur Novaseq 6000 ILLUMINA. Les analyses des données scRNA-Seq ont été réalisées chez GenoSplice. Les filtres suivants ont été appliqués pour générer une matrice globale utilisée dans la suite de l'analyse : cellules avec UMI (Unique Molecular Identifier apparenté au code-barre de la cellule)  $\geq 2000$ , nombre de gènes détectés  $\geq 800$ , et cellules avec UMI dans les gènes mitochondriaux  $\leq 10\%$ . Le clustering nous a permis de différencier 19 populations cellulaires. Grâce aux marqueurs de ces populations publiés dans la littérature, nous avons pu identifier le type cellulaire de chacune de ces populations.

L'analyse de trajectoire a été réalisée par les algorithmes Monocle 2 et Velocity. Monocle 2 permet de modéliser une trajectoire de différenciation des cellules. Chaque cellule est ensuite associée à une trajectoire. Dans notre étude, l'application de Monocle 2 a réparti les populations cellulaires sur 3 trajectoires différentes. Velocity a permis l'analyse de la dynamique de transcription représentant la flèche comme l'évolution de la cellule.

## Résultats

Afin de vérifier que le traitement ASNase induit l'activation de l'ISR, les niveaux d'expression des protéines activées lors d'un manque en acides aminés sont mesurés entre les différents groupes expérimentaux. Sans surprise, les formes totales des protéines ATF4, de l'asparaginase synthétase, de GCN2 et de la Sestrin-2 ainsi que la forme phosphorylée de GCN2 sont augmentées chez les rats WT ASNase par rapport aux rats WT Vhcl. Ces différences d'expressions protéiques ne sont pas retrouvées chez les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>*. Ces résultats confirment que l'ASNase induit un manque en acides aminés et que GCN2 est nécessaire pour activer l'ISR et répondre au stress induit.

De plus, que ce soit lors d'un stress inflammatoire ou lors d'une déplétion en acides aminés, l'autophagie est une des voies activées par l'ISR. L'activation de l'autophagie permet l'apport rapide ou le maintien d'un stock d'acides aminés<sup>159,327</sup>. Ainsi, l'augmentation d'expression des protéines ATG3 et p62 chez les WT ASNase par rapport au *Gcn2<sup>-/-</sup>* ASNase, permet de confirmer l'activation de la voie de l'autophagie chez les WT ASNase. A l'inverse, l'essai TUNEL montre une augmentation de l'apoptose chez les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* ASNase par rapport à WT ASNase.

Nous pouvons en déduire que la protéine GCN2 est essentielle à l'activation de l'ISR et de l'autophagie. La délétion de GCN2 entraîne une augmentation de l'apoptose en réponse à la privation d'asparagine et de glutamine.

Nous avons ensuite cherché à explorer plus en détails les mécanismes liés à la perte de GCN2. Une analyse du transcriptome par séquençage haut débit (RNAseq) nous a montré que très peu de gènes sont différentiellement exprimés entre les rats *Gcn2<sup>-/-</sup>* et WT à l'état basal. Ce résultat est cohérent avec l'absence de phénotype observé chez les rats KO.

A l'inverse, l'analyse de l'expression différentielle entre les groupes *Gcn2<sup>-/-</sup>* ASNase et WT ASNase a dénombré 680 gènes différentiellement régulés à la hausse et 628 gènes différentiellement régulés à la baisse.

L'algorithme d'analyse d'enrichissement des ensembles de gènes (GSEA : *Gene set enrichment analysis*), axé sur les gènes exprimés de manière différentielle (DEGs : *Differentially expressed genes*) entre les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase et WT ASNase, a révélé un certain nombre de gènes significativement surexprimés impliqués dans l'inflammation. Certains de ces gènes ont été vérifiés par qPCR comme le gène *NFKB2* impliqué dans la signalisation du TNF- via NFK- B, les gènes *IL6*, *IL1β*, *SELE* et *CCL2* impliqués dans la réponse inflammatoire et *MYD88* impliqué dans la réponse à l'interféron gamma.

Deux sous-unités de la calprotectine, codées par les gènes *S100A8* et *S100A9*, sont 30 fois augmentées chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase par rapport aux rats WT ASNase. Ces gènes sont associés à l'ensemble des gènes Hallmark de la voie du complément. Dans des conditions d'ASNase, la concentration de calprotectine, déterminée par ELISA, augmente de manière significative dans le sérum des rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> par rapport aux rats témoins. La calprotectine est une molécule DAMP (*Damaged Associated Molecular Pattern*) capable d'activer les récepteurs TLR (*toll-like receptors*). On observe une augmentation de l'expression des TLR 2, 6, 8, 9, 10, 11, 13 ainsi que MYD88 chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase. MYD88 est une protéine adaptatrice cytosolique qui relie les récepteurs Toll-like à d'autres intermédiaires de signalisation intracellulaires lorsque les TLR sont activés. Dans l'ensemble, ces résultats rendent compte d'une activation des gènes de la voie TLR-MYD88.

De plus, la calprotectine est synthétisée par les neutrophiles et les monocytes dont l'augmentation a été retrouvée dans les analyses du single cell RNAseq (résultats décrits dans le paragraphe suivant).

L'inflammation est également détectée au niveau histologique où une infiltration par des cellules inflammatoires est observée dans le poumon des rats *Gcn2*<sup>-/-</sup>ASNase. L'infiltration cellulaire est principalement périvasculaire avec une augmentation des éosinophiles, des neutrophiles et des plasmocytes. Ces lésions inflammatoires ne sont pas observées chez les rats WT ASNase.

En résumé, un des mécanismes moléculaires majoritairement observé chez le rat *Gcn2*<sup>-/-</sup> traité par l'ASNase, est l'inflammation. Cette activation de la réponse inflammatoire est confirmée par les analyses des différentes populations cellulaires présentes chez le rat *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase.

En effet, les neutrophiles et les monocytes sont les deux populations les plus augmentées chez les  $Gcn2^{-/-}$  ASNase comparés aux autres groupes expérimentaux.

Contrairement aux résultats des rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase, les données du single-cell-RNAseq des rats  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl contrastent avec les résultats du RNAseq.

En effet, une population de lymphocytes T, exprimant la protéine LAG3 (marqueur des cellules T activées), est présente uniquement chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl. De plus l'analyse des gènes exprimés de manière différentielle au sein de chaque population cellulaire, a révélé que les cellules endothéliales possèdent une forte modulation génétique entre les rats  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl et WT Vhcl. BMPR2, le principal gène de prédisposition à l'HTAP, ainsi que le gène ENG, codant pour l'endogline, et IL33, impliquée dans l'activation des cellules immunitaires, sont régulés à la hausse dans les cellules endothéliales des rats  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl.

Il est intéressant de noter que l'analyse de l'enrichissement des voies des DEG de la population cellulaire T\_LAG3 a révélé une régulation négative des ribosomes et de la voie de transport de l'ARNm chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  par rapport aux rats WT dans des conditions non stimulées.

Sous traitement par l'ASNase, l'ISR semble être activée dans les neutrophiles des rats WT car les gènes DDIT3 et ATF3 sont exclusivement régulés à la hausse chez les rats WT ASNase.

Les résultats du single-cell RNAseq nous ont donc permis de confirmer l'activation de l'inflammation chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase par rapport aux rats WT ASNase.

Les résultats du single-cell-RNAseq apportent un nouvel axe de discussion autour de cette population T\_LAG3. Comme elle est uniquement présente chez les  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl, cette population laisse sous-entendre que des mécanismes s'installent même en conditions non stimulantes chez les rats  $Gcn2^{-/-}$ .

# Article

---

***Gcn2 (Eif2ak4<sup>-/-</sup>)* deficient rats display molecular and cellular lung dysregulation in basal and stress conditions**

Juliette Bignard<sup>1</sup>, Fabrice Atassi<sup>1</sup>, Olivier Claude<sup>1</sup>, Maria-Rosa Ghigna<sup>2,3</sup>, Nathalie Mougenot<sup>4</sup>, Bahgat Soilih Abdoukarim<sup>3</sup>, Florence Deknuydt<sup>5</sup>, Aurélie Gestin<sup>5</sup>, David Montani<sup>3,6</sup>, Sophie Nadaud<sup>1</sup>, Florent Soubrier<sup>1</sup>, Frédéric Perros<sup>3,6</sup>

*1. Sorbonne Universités, INSERM, UMR\_S 1166, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France*

*2. Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France*

*3. UMR\_S 999, INSERM and Université Paris–Saclay, Laboratoire d'Excellence en Recherche sur le Médicament et l'Innovation Thérapeutique, Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France*

*4. Sorbonne Université, UMS28, Plateforme d'Expérimentation Cœur, Muscles, Vaisseaux (PECMV), 75013, Paris, France*

*5. Flow cytometry core Cyto-ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France*

*6. AP-HP, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France*

## Abstract

Hereditary pulmonary veno-occlusive disease (hPVOD) is a severe form of autosomal recessive pulmonary hypertension, and is due to biallelic loss-of-function of the *EIF2AK4* gene (alias *GCN2*) coding for GCN2. GCN2 is a stress kinase that belongs to the integrated stress response pathway (ISR). We created three different *Eif2ak4* (*Gcn2*) deletions with CRISPR-CAS9 technology generating three rat lines. These rats did not spontaneously develop a PVOD-related disease. We submitted these rats to a metabolic stress to document the molecular and cellular response of the lungs and to identify phenotypic changes that could be involved in PVOD pathophysiology. *Gcn2* mutant rat lungs were analyzed under basal conditions and three days after a single administration of PEG-asparaginase (ASNase). Lung mRNAs were analyzed by RNASeq and single cell RNASeq (scRNA-seq), flow-cytometry, tissue imaging, and western-blot. The ISR was not activated after ASNase treatment in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rat lungs, and apoptosis was increased. Several genetic markers of inflammation and innate immunity were overexpressed, and inflammatory cell infiltration was also observed in the perivascular area. Under basal conditions, scRNA-seq analysis of *Gcn2*<sup>-/-</sup> rat lungs revealed increases in two T cell populations, a LAG3<sup>+</sup> T cell population and a proliferative T cell population. Following ASNase administration, we observed an increase in calprotectin expression involved in TLR pathway activation and neutrophil infiltration. Under basal and metabolic stress conditions, *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats display molecular and cellular signatures in the lungs that may indicate a role for Gcn2 in immunity homeostasis and provide further clues to the mechanisms of PVOD development.

## INTRODUCTION

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) is a rare and severe lung disease characterized by pulmonary vascular remodeling. Vascular remodeling involves small veins and venules with intimal fibrosis and medial hypertrophy, muscular hyperplasia of interlobular septal veins, and arterial remodeling illustrated by profound media hypertrophy of small arteries<sup>1,2</sup>. As lumen diameter decreases, pulmonary vascular resistance increases and thus leads to progressive right ventricular failure.

PVOD presents either as a sporadic disease, occurring late in life and can be favored by tobacco consumption, occupational exposure to organic solvents, alkylating agent treatment, or as a hereditary form<sup>3-5</sup>. The hereditary form (hPVOD) is due to pathogenic variants present in the *EIF2AK4* gene (also known as and hereinafter as *GCN2*) rendering both alleles nonfunctional. hPVOD is inherited in an autosomal recessive manner with near complete penetrance, although the age of disease onset may vary, occurring from birth until 50 years of age<sup>6</sup>. The relationship between *GCN2* gene deficiency and pulmonary disease development remains unknown, as no clear links between gene function and the pathological lung lesions have yet been identified. The GCN2 protein is known to have a central role in sensing and responding to amino acid deficiency by shutting down protein translation, a mechanism common to all mammalian cells<sup>7</sup>. During cellular conditions of amino acid starvation, the cytoplasmic kinase GCN2 is activated by dimerization and autophosphorylation and binds uncharged tRNAs with high affinity<sup>8</sup>.

To decipher the mechanisms linking amino acid deficiency sensing and PVOD development, we interrupted *Gcn2* function in Sprague-Dawley rats by introducing small gene deletions using CrispR-CAS9 genome editing technology. In contrast to humans carrying *GCN2* biallelic mutations, homozygous *Gcn2*-deficient rats do not develop PVOD, either spontaneously or in response to various stresses, as previously observed in *Gcn2* mutant mice. *Gcn2*-deficient rats are, however, exquisitely sensitive to acute asparagine and glutamine deprivation induced by

asparaginase administration, in contrast to wild-type rats. We therefore analyzed changes in mRNA expression and cell populations in the lungs of wild-type and *Gcn2*-deficient rats. We highlighted the critical role of GCN2 in both the pulmonary inflammatory response and T cell development.

## METHODS

***In vivo study design*** - *Gcn2*- (alias *Eif2ak4*) deficient rats were generated on a Sprague Dawley background using the CrispR-CAS9 method as previously described<sup>9</sup>. Briefly, a frameshift deletion was introduced in the first exon of the *Gcn2* gene to disrupt the gene. We developed three lines with biallelic deletions of 152 bp, 41 bp, and 25 bp; designated *Gcn2*<sup>152-/-</sup>, *Gcn2*<sup>41-/-</sup> and *Gcn2*<sup>25-/-</sup>, respectively. Three-week-old rats were genotyped using genomic DNA obtained from ear punches as described in Manaud *et al.*<sup>9</sup>. PCRs were performed using 5X Herculase, and primers were designed to encompass mutant sequences (DNA bases: UPTE71-EIF2AK4: 5'-GAGGTCCCGTTTTTCAGAGC-3' and LoTE71-EIF2AK4: 5'-AAGTCGAGGTGGGGAAGAAT-3'). Eight- to ten-week-old male and female rats weighing approximately 400 g were randomly assigned to receive either an intramuscular injection of 75 U/kg PEG-asparaginase (ASNase; Oncaspar, Shire) or an equal volume of vehicle (Vhcl; 0.9% NaCl). Because ASNase induces dramatic weight loss in *Gcn2* mutant rats, animals were euthanized three days post-injection (corresponding to a 20% weight loss threshold), through exsanguination under anesthesia. Blood and organs were collected for histological and molecular studies. Two lung lobes from each animal were inflated with OCT and either flash-frozen in isopentane on liquid nitrogen or fixed in paraformaldehyde for 72 hours. Remaining lobes were flash-frozen in liquid nitrogen.

***RNA preparation and RNAseq analysis*** - Frozen lung samples were processed to obtain high-quality RNA for RNA Sequencing (RNAseq). A detailed protocol is provided in supplemental data. Final pooled sample libraries were sequenced on the Novaseq 6000 ILLUMINA, generating  $2 \times 5.10^7$  paired-end base reads per sample after demultiplexing. Bioinformatic analyses were performed at the Paris ICM Institute's Data Analysis Core ([iconics.institutducerveau-icm.org/](http://iconics.institutducerveau-icm.org/)). Data were normalized with DESeq2 (v1.26.0) bioconductor packages, prior to differential analysis with the DESeq2 workflow. Multiple tests-

adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Finally, enrichment analysis was conducted using Hallmark databases and KEGG pathways with the clusterProfiler R package (v3.14.3) with Gene Set Enrichment Analysis.

**Single-cell RNAseq** - For every experimental group, three female rats from each KO line: *Gcn2*<sup>152<sup>-/-</sup></sup>, *Gcn2*<sup>41<sup>-/-</sup></sup>, and *Gcn2*<sup>25<sup>-/-</sup></sup> were euthanized and exsanguinated. Lungs were inflated with enzymatic solution (1.76 U/ml dispase, 0.15 U/ml collagenase) and slowly stirred at 37°C for 1 hour in 20 ml of enzymatic solution. Following digestion, lungs were pooled and cells were mechanically dissociated by carefully mincing into small pieces (2 to 3 mm<sup>3</sup>). The resulting cell suspension was filtered through a 70-micron sieve in order to eliminate cellular debris, then red blood cells were lysed. After washing, viable cells were selected by cell sorting using Zombie-green (Biolegend). SingleCell library prep were performed with chromium from 10X Genomics. Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM kit and Chip G were used, following the manufacturer's recommendations. A total of 5,000 to 20,000 cells were loaded onto chromium and sequenced on the Novaseq 6000 ILLUMINA. Using a 100-cycle ILLUMINA cartridge, calculations were based on a minimum of 20,000 reads/cell per sample. scRNA-Seq data analyses was performed at GenoSplice ([www.genosplice.com](http://www.genosplice.com)). Detailed bioinformatic methods are described in supplemental data.

## RESULTS

### ***Gcn2*<sup>-/-</sup> rat phenotype under basal and stress conditions**

After more than 12 months of observation by echocardiography and lung sections morphometry analyses, *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats did not develop spontaneous PVOD nor any other obvious phenotype. Attempts to induce the disease using known GCN2 function-related stresses (amino acid deprivation, hypoxia, inflammation) were unsuccessful (results not shown)<sup>10</sup>.

### **Systemic responses to asparaginase in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats**

Considering GCN2 is one of the main sensors of amino acid starvation in the organism, we injected asparaginase (ASNase) at a dose of 75 U/Kg in both wild-type and homozygous *Gcn2* KO rats in order to evaluate their response to metabolic stress in the presence or absence of functional GCN2. The chemotherapy agent ASNase depletes serum levels of asparagine and glutamine, starving cells of essential substrates, and induces GCN2 activation. ASNase treatment induces rapid weight loss in *Gcn2*<sup>-/-</sup> animals with health status deterioration, therefore experiments were stopped at three days post-injection (Figure 1A). In contrast, wild-type animals did not show any detectable physiological deterioration. Macroscopic observation of the organs from ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> animals revealed a yellowish liver, which upon microscopic examination, contained vacuoles (Figure E1 in supplemental data). ASNase-induced asparagine and glutamine starvation was the only condition in which we observed a phenotypic difference between *Gcn2*-deficient rats and WT rats.

### **Asparaginase induced an integrated stress response (ISR) and autophagy in WT rat lungs and increased apoptosis in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rat lungs.**

ASNase treatment increased phospho-(T899)-GCN2 and total GCN2 protein in WT animals, neither of which were detected in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Figure 1, B1 and B2)<sup>11</sup>. Consistent with this

result, ATF4 (Activating transcription factor 4), one of a downstream component of ISR, was significantly increased in ASNase-treated WT animals but remained unchanged in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> animals (Figure 1C). Asparaginase synthetase and Sestrin-2 proteins, known transcriptional targets of ATF4, were also increased in ASNase-treated WT animals (Figure 1B and 1C). We measured the expression of another EIF2 kinase, PERK, which is activated by endoplasmic reticulum stress. PERK was significantly increased in WT rats treated with ASNase and was unchanged in similarly-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Figure 1B). These results demonstrate that the integrated stress response (ISR) is activated in ASNase-treated WT animals but is not induced in *Gcn2*<sup>-/-</sup> animals. Given that the downstream autophagy pathway is triggered by GCN2-induced-ISR during amino acid starvation and/or inflammatory stress<sup>12,13</sup>, we therefore assessed autophagy using four different protein markers; p62, LC3B, ATG3, and ATG5. ATG3 and p62 increased with ASNase treatment in WT rats as compared to *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, whereas LC3B and ATG5 remained stable in both WT and *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats following ASNase treatment (Figure 2, A-B). In summary, in contrast to WT rats, ISR and autophagy was not induced in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats in response to asparagine and glutamine deprivation.

Global lung apoptosis was significantly increased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats as compared to WT rats after ASNase treatment, as measured by TUNEL. In contrast, there was no difference at basal conditions (Figure 2C).

### **RNAseq experiments reveal whole lung inflammation in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats.**

We performed RNAseq transcriptome analysis to document the lung response to ASNase-induced metabolic stress in both WT and *Gcn2*-deficient rats. Results were compared with those from *Gcn2*<sup>-/-</sup> and WT rats treated with vehicle (NaCl 0.05%, Vhcl) corresponding to basal conditions. Under basal conditions, only a few genes were differentially regulated between *Gcn2*<sup>-/-</sup> and WT rats, consistent with the absence of phenotypic abnormalities in KO rats.

Expression analysis showed a total of 680 differentially upregulated and 628 differentially downregulated genes between *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase and WT ASNase groups (Figure 3, A-B).

In order to identify which gene networks were altered during ASNase treatment, differentially expressed genes (DEGs) were investigated using the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) algorithm based on the Hallmark collection of Molecular Signature Database (MSigDB). This analysis revealed a number of significantly upregulated genes related to inflammation (Figure 3D), e.g., *Nfkb2* (Hallmark geneset: TNF- $\alpha$  signaling via NF- $\kappa$ B), *Ccl2* (encoding MCP-1), *Il6*, *Il1b*, *Sele* coding for E-selectin (Hallmark geneset: inflammatory response), and *Myd88* (Hallmark geneset: interferon gamma response). These genes found to be upregulated with RNAseq in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats were confirmed with qPCR (Figure 4, A-F). In addition, the Hallmark geneset inflammatory response gene heatmap illustrated that several inflammatory genes were uniquely overexpressed in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Figure 3C). Calprotectin is synthesized by neutrophils and monocytes and is part of the classical complement pathway. The two calprotectin subunits are encoded by the *S100a8* and *S100a9* genes which underwent a more than 30-fold increase in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Table E1). Under ASNase conditions, serum calprotectin levels significantly increased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats compared to WT rats, as determined by ELISA (Figure 4G). Calprotectin is a known damage-associated molecular pattern (DAMP) component, able to activate toll-like receptors (TLR) by an autocrine mechanism (on peut mettre 29). Indeed, we observed increased expression of *Tlr-2*, *-6*, *-8*, *-9*, *-10*, *-11*, and *-13* in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Table E1). *Myd88*, one of the most upregulated genes, codes for a cytosolic adaptor protein linking activated Toll-like receptors with other intracellular signaling intermediates. Altogether, these results demonstrate activation of the TLR-MYD88 pathway genes. Inflammation is also detected at the histological level. Interstitial edema and inflammatory cell infiltration are observed in the lungs of *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats treated with ASNase. This cell infiltration is composed of granulocytes and appears to be

predominantly perivascular. These inflammatory lesions are not observed in ASNase-treated WT rats (Figure E2).

### **Identification of cell populations in whole rat lung tissue by scRNA-seq.**

scRNA-seq was performed on pooled samples of three lungs from each KO line (*Gcn2*<sup>152<sup>-/-</sup></sup>, *Gcn2*<sup>41<sup>-/-</sup></sup> and *Gcn2*<sup>25<sup>-/-</sup></sup>) in order to neutralize any potential off-target events inherent to CrispR-CAS9 technology. A single pool of animals was analyzed per experimental group (*Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase, WT ASNase, *Gcn2*<sup>-/-</sup> Vhcl, and WT Vhcl). All sequencing experiments passed quality control steps (Figure E3). A total of 18,201 cells were analyzed and a median 1341 genes were detected per cell. mRNA expression clustering enabled us to identify 19 distinct cell populations (Figure 5A). Each cell population was characterized by the expression of known markers (Figure 5B). We grouped cell clusters into three cell families: epithelial cells, immune cells, and vascular cells (Figure 5C). In the epithelial cell group we observed club cells and a rare population of Tuft cells, also known as brush cells, which were characterized by *Dclk1* and *Lrmp* expression<sup>14,15</sup>. The vascular wall cell group was composed of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. Interestingly, ASNase treatment increased endothelial cell number only in WT rats, whereas fibroblasts were increased in *Gcn2*-deficient rats as compared to the other experimental groups. Immune cell numbers also underwent significant changes. In the myeloid lineage, neutrophils and classical monocytes were strongly increased in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, and non-classical monocytes were also increased to a lesser extent. Two populations of T-lymphoid cells expressing CD3 were unexpectedly increased under basal conditions in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats. One population was characterized by predominant expression of the *Lag3* gene, encoding an inhibiting receptor of T cells (T\_LAG3). This population was comprised of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and was only observed in untreated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, and disappeared with ASNase treatment. Another T cell population was also increased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions but did not express *Lag3*. This population was shown to exist in a

proliferating state as attested by increased *Mki67* expression. The evolution of this population is further analyzed below (Figure 5D).

### **ScRNA-seq experiments highlight cell population-specific gene and pathway regulation.**

Differentially expressed genes (DEGs) were analyzed across cell populations identified through scRNAseq. This analysis revealed genes whose differential expression was specific to an experimental condition and/or a particular cell type. Under basal conditions, only T\_LAG3 and endothelial cell populations displayed a large number of DEGs between *Gcn2* mutant and WT rats. In contrast, under ASNase conditions, most of the individual cell populations exhibited high numbers of DEGs between the two groups (Figure 6A). Several gene modulations were detected in endothelial cells of *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions. Indeed, *Bmpr2*, the major predisposing gene for PAH, was upregulated in endothelial cells from *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats. *Eng*, encoding the vascular endothelium glycoprotein endoglin, and *Il33*, encoding an interleukin involved in immune cell activation, were also exclusively upregulated in endothelial cells from the *Gcn2*<sup>-/-</sup> Vhcl group (Figure 6B). In endothelial cells from ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, one of the most upregulated genes was leucine-rich-alpha2-glycoprotein, *Lrg1* ( $p=1.37 \times 10^{-4}$ ,  $\log_{2}FC=1.33$ ; Figure 6B). LRG1 belongs to the leucine-rich repeat family of proteins involved in protein-protein interaction, and to the TGF- $\beta$  signaling pathway. In T\_LAG3 cells, *Gata3*, a transcription factor involved in T cell development, proliferation, and maintenance, was exclusively upregulated in the *Gcn2*<sup>-/-</sup> Vhcl group (Figure 6B). Interestingly, DEG pathway enrichment analysis from the T\_LAG3 population revealed downregulation of ribosomes and the mRNA transport pathway in *Gcn2*<sup>-/-</sup> compared to WT rats under basal conditions (Table E2). The ISR was activated in neutrophils as *Ddit3* and *Atf3* genes were exclusively upregulated in WT but not in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats following ASNase treatment (Figure 6B).

### ***Trajectory analysis of the cell populations***

The single-cell trajectory inference method uses scRNAseq data and then computationally orders cells along a pseudo-time trajectory on the basis of expression pattern similarities. In order to determine the potential lineage differentiation between cell populations, we used the Monocle-2 algorithm to infer differentiation trajectories for a subset of 1952 genes expressed in the majority of cells from the scRNAseq experiments (using M3drop). This analysis generated a structure composed of three branches representing three populations, consistent with cluster analysis (Figure E4, A). One branch included T cells, another branch included myeloid cells, and the third contained the epithelial and vascular cell populations. This analysis was consistent with the cell clustering identification generated from scRNASeq. T\_LAG3 cells and T\_Naïve cells were concentrated on the same position of branch 1, whereas clusters representing B cells, NK cells, CD8 cytotoxic cells, and ILC2 cells were more heterogeneously arrayed along branch 1, suggesting that those clusters were in similar states of differentiation. The proliferating T cell population was also heterogeneously distributed, a result expected from dividing cells (Figure E4, B).

RNA velocity, the time derivative of the gene expression state, can be estimated by distinguishing between spliced and unspliced mRNAs<sup>16</sup>. Using RNA velocity analysis, the T cell proliferating cluster is likely the origin of other T cell clusters, in particular T\_LAG3 cells and NK T cells. Interestingly, T\_Naïve cells evolve towards T\_LAG3 and T\_Eff, two populations with T cell activation markers (Figure 6C). The evolution of T\_Naïve cells is thought to be differentially regulated in *Gcn2*<sup>-/-</sup> Vhcl rats as the T\_LAG3 cell population is only found in this group. Velocity analysis also highlighted the dynamic evolution of fibroblasts which are known to have phenotypic plasticity. Club cells displayed the greatest evolution dynamics and appeared oriented towards Tuft cells, an expected result because they both belong to the epithelial cell family (Figure 6C).

### **Flow-cytometry analysis and immunofluorescence imaging confirm cluster identification and differential regulation.**

The T\_LAG3 population found only in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions was confirmed by flow cytometry analysis. Using lungs from an additional set of *Gcn2*<sup>-/-</sup> Vhcl and WT Vhcl rats (n=5/group), we analyzed cells from whole lungs in order to validate the increase in T\_LAG3 cells in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions observed by scRNAseq. We used the CD3 cell surface marker to identify the global T cell population. CD4 and CD8 cell surface markers were added to determine the proportion of LAG3<sup>+</sup> T cells in CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell populations. Finally, we used the LAG3 marker to investigate the T\_LAG3 population. Interestingly, we observed that the increase in LAG3 marker expression was essentially intracellular (without permeation there was no signal for either condition). Furthermore, the percentage of CD3<sup>+</sup>/LAG3<sup>+</sup> cell populations significantly increased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions as compared to WT, thus confirming our scRNAseq results (Figure 7A). The percentage of LAG3<sup>+</sup> cells tended to increase in both CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> populations (p=0.09; Figure 7A). Flow cytometry analysis demonstrated that the LAG3 increase appeared to be principally detected within the intracellular compartment, suggesting that the T\_LAG3 population remains in an unstimulated state in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions. T cell proliferation was assessed by double labeling with CD3 and Ki67 antibodies followed by immunofluorescence (IF) analyses. A two-fold increase in dual-positive cells illustrated greater T cell proliferation in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions (Figure 7D).

The significantly increased expression of *S100a8* and *S100a9* genes encoding calprotectin subunits suggested an increase in neutrophil populations as confirmed by scRNAseq. The increased neutrophil cell population in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats was validated by IF with calprotectin antibodies (Figure 7B). Double staining with Von Willebrand factor indicates that

the neutrophil infiltration is mainly perivascular. Given that MMP9 is produced under inflammatory conditions, we used it as an additional neutrophil infiltration marker similar to calprotectin<sup>17</sup>. Western blot experiments further demonstrated that MMP9 was increased in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats (Figure 7C). Altogether, these results demonstrating the infiltration of activated neutrophils in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats confirm an active inflammatory state.

## DISCUSSION

We generated genetically *Gcn2*-deficient rats by CrispR-CAS9 in an attempt to create an animal model of heritable PVOD. These rats, as well as *Gcn2* KO mice, do not develop spontaneous PVOD, even after twelve months. Moreover, PVOD did not occur in *Gcn2*-deficient rats, even after the induction of various short- or long-term stressors, such as inflammatory or amino acid deprivation. To induce short-term metabolic stress, we used asparaginase, an anti-leukemia drug that causes asparagine and glutamine deficiency. We found it to be the only experimental condition that strongly discriminated between WT and *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats since *Gcn2* mutant rats underwent rapid weight loss with fatal consequences within a few days of administration, whereas WT rats did not show any significant physiological failure.

We conducted transcriptomic profiling and scRNAseq in *Gcn2*<sup>-/-</sup> and WT rat lungs three days after a single ASNase injection to derive insights into the molecular and cellular responses to this stress.

Under basal conditions, only five genes were differentially regulated, consistent with the absence of phenotypic alterations in *Gcn2*-deficient rats. However, *Gcn2*-deficient rat lungs contained large populations of T\_LAG3 cells expressing LAG3, a CD4 homologue that binds MHC class II molecules with very high affinity and has an intrinsic negative regulatory T cell function. Other studies have shown that persistent antigen exposure results in sustained LAG3 expression and contributes to a state of “exhaustion” responsible for impaired proliferation of T cells and decreased cytokine production<sup>18</sup>. Previous reports have demonstrated that LAG3 is mainly localized in the intracellular compartment and is translocated to the cell surface upon stimulation<sup>19</sup>. Using flow cytometry, we confirmed that LAG3 had intracellular localization in this T cell population from *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under basal conditions. Under unstimulated conditions, the majority of LAG3 does not reach the cell surface and likely undergoes degradation within lysosomal compartments<sup>19</sup>. Nevertheless, DEGs analysis of T\_LAG3 cells highlighted

increased *Lag3* expression in *Gcn2*<sup>-/-</sup> compared to WT rats under basal conditions. Given that intracellular LAG3 is accumulating in these *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, the degradation pathway might be impaired.

In combination with the results from trajectory analysis demonstrating that T\_LAG3 cells and T\_Naïve cells were at the same stage of differentiation, we speculate that GCN2 loss prevents normal T\_Naïve cell development, resulting in a unique T cell population with defective lysosomes. We therefore demonstrate an essential role for GCN2 in T cell differentiation independent to amino acid starvation.

Interestingly, the T\_Prolif cell population also increased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats under non-stimulated conditions. Considering that this cell population expresses LAG3 at higher level in *Gcn2* deficient rats, it is possible that T\_LAG3 cells are proliferating at higher rates than in WT animals.

The T\_LAG3 population is no longer detected after ASNase treatment. Considering that GCN2 and amino acid supply are both necessary for T cell survival and differentiation, it is likely that GCN2-deficient T\_LAG3 cells undergo cell death with ASNase treatment. It has been previously shown that T cells (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), B cells (B220<sup>+</sup> sIgM<sup>+</sup>), and leukocytes (CD11b<sup>+</sup>) from *Gcn2*<sup>-/-</sup> mice demonstrate enhanced cell death when exposed to ASNase-induced amino acid deficiency<sup>20</sup>.

The effects of GCN2 on T cell proliferation in the context of amino acid starvation is controversial. Our present data show decreased numbers of proliferating T cells in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, a result consistent with the report of Van de Velde *et al.* demonstrating that both wild-type and GCN2-deficient T cells failed to proliferate in low concentrations of different amino acids (asparagine, leucine, tryptophan, and arginine)<sup>21</sup>. Moreover, we suggest that the decrease of T\_Prolif is also due to the immunosuppressing effect of ASNase. The

lymphocyte T expressing LAG3 in proliferating state is also likely to undergo cell death under ASNase treatment.

Considering that GCN2 has been reported to play a role in immune cell differentiation<sup>22,23</sup> it is possible that *Gcn2*-deficient T cells cannot differentiate as efficiently as WT T cells during asparagine and glutamine starvation. Indeed, we found that the T\_Eff population, corresponding to activated T cells, was significantly decreased in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats compared to WT rats with ASNase treatment, whereas T\_Naïve populations, corresponding to quiescent T cells, remained unchanged between experimental groups. Moreover, instead of being necessary for T cell proliferation, as proposed by Munn *et al.*<sup>24</sup>, Van de Velde *et al.* suggested that GCN2 is required for normal cytotoxic T\_Eff function. The possible inability of T\_Eff to lyse activated antigen presenting cells could be one cause of increasing inflammatory status observed under amino acid starvation conditions. We can hypothesize that T cell dysfunction under basal conditions combined with the immunosuppressive effects of ASNase treatment results in amplified inflammatory processes in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats.

Altogether, GCN2 loss impedes normal T cell development and leads to their proliferation, resulting in an increased T\_LAG3 population which is unable to survive when rats are undergoing metabolic stress. ASNase treatment affects GCN2-deficient T cell differentiation, resulting in decreased T\_Eff populations, and, possibly, cytotoxic dysfunction.

GCN2 has already been demonstrated as critically important in limiting asparaginase toxicity in the liver and pancreas in rodents<sup>25,26</sup>. Consistent with these results, cytosolic vacuoles were present in yellowy livers from ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats, suggesting steatosis and inflammation. Indeed, ASNase treatment rapidly led to severe morbidity in GCN2-deficient rats indicating a high sensitivity to asparagine and glutamine depletion. We cannot exclude the

possibility that inflammatory mediators originating from other organs, such as the liver or intestine, could target the lungs and indirectly induce lung injury.

As previously described in mice, we confirm that the GCN2 protein kinase is required to activate integrated stress responses in rats treated with ASNase. In accordance with the previous observation that ISR failure can drive cells towards apoptosis<sup>20</sup>, we showed that apoptosis increased in lung cells from ASNase-treated *Gcn2*-deficient rats using the TUNEL assay. Given there is growing evidence that cell death can activate the immune response either by the transfer of antigens to the immune system or by the release of DAMPs<sup>27,28</sup>, we speculate that increased cell death is an inflammatory trigger in ASNase-treated *Gcn2*-deficient rats. Ravishankar *et al.* demonstrated the important role of GCN2 in regulating the tolerogenic response to apoptotic cell antigens by inducing IL-10 and TGF- $\beta$  production in macrophages<sup>29</sup>. This expected increase was not observed in either WT or *Gcn2* mutant rats, a discrepancy that could be due to experimental differences, since Ravishankar triggered apoptosis with LPS. We then identified a DAMP molecule called calprotectin, whose two subunits are encoded by the *S100a8* and *S100a9* genes, and which were strongly overexpressed and also increased in the serum of ASNase-treated *Gcn2* mutant rats. Several reports have suggested that the immune system senses cell death via the TLR2 and/or TLR9 pathway(s)<sup>30</sup>. In fact, DAMP molecules, such as calprotectin, can either activate the TLR pathway in sentinel cells (macrophages and mast cells) or in an autocrine manner via neutrophils<sup>31,32</sup>. This data, along with our current results demonstrating *Tlr2*, *Myd88*, *Il6*, and *Il1b* overexpression, collectively establish that increased cell death could be responsible for increased inflammation processes by releasing calprotectin and inducing TLR pathway activation. Calprotectin is involved in neutrophil migration to inflammatory sites<sup>33</sup> and its increased expression in *Gcn2* mutant rats likely explains, at least in part, the increased neutrophil cell population as attested by scRNAseq and immunofluorescence analysis of lung cells. Immunofluorescence analysis of lung sections

indicated that the neutrophil population localizes to perivascular areas. Perivascular neutrophils increased in parallel with increased MMP9, known to promote revascularization at injury sites<sup>34</sup>, and could suggest a possible role for neutrophils in vascular remodeling. It was previously shown that neutrophils facilitate monocyte recruitment, likely explaining increased numbers of monocytes in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats<sup>35</sup>. Finally, inflammation activation could also be due to defective autophagy in *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats. Ravindran *et al.* demonstrated an enhanced inflammatory response in the gut of *Gcn2*<sup>-/-</sup> mice following dextran sodium sulfate (DSS) oral administration that was due to absent autophagy activation<sup>13</sup>. Consistent with their results, we found that autophagy was not induced in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> rats in contrast to WT. These results were obtained at the protein level on key elements from these two pathways.

Endothelial cells (ECs) play a major role in vascular remodeling and several genes of interest were strongly modulated in this cell population. We observed a major increase in *Lrg1* gene expression in ASNase-treated *Gcn2*<sup>-/-</sup> mutant rats. LRG1 is mitogenic for endothelial cells in the presence of TGF- $\beta$ 1 and induces angiogenesis. Owing to its interaction with endoglin, LRG1 increases both endothelial TGF- $\beta$  type II receptor, as well as ALK1 activation and signaling, by activating the Smad1/5/8 pathway<sup>36</sup>. More recently, Singhal *et al.* showed that in the presence of a primary tumor, ECs transcriptionally induced *LRG1* expression, and LRG1 was increased in the serum of cancer patients<sup>37</sup>. They also demonstrated that LRG1 increased the number of NG2<sup>+</sup> perivascular cells. *Lrg1* upregulation in lungs from *Gcn2*-deficient rats under stress conditions might offer a clue to understanding the large ECs proliferation conferring a capillary hemangiomas aspect observed in some patients with hPVOD. *BMPR2* and *endoglin*, two genes involved in BMP signaling in endothelial cells and linked to hereditary predisposition to PAH development, were found upregulated in endothelial cells from *Gcn2* mutant rats under basal conditions. In contrast to our results, *BMPR2* was found decreased in a rat model of PVOD induced by an alkylating agent<sup>38</sup>. Our results also suggest an activation of

endothelial cells through IL-6 and E-selectin as RNAseq revealed that their transcripts were increased. E-selectin increase in endothelial cells mediates rolling along the activated endothelium, neutrophil chemoattraction, and capture likely participating to neutrophil recruitment in *Gcn2* deficient rats<sup>39,40</sup>.

There are some limitations to our study that must be discussed. The first is the absence of PVOD development in *Gcn2*-deficient rats, which prevented the observation of the molecular and cellular events associated with vascular remodeling. The scRNAseq experiments might have been biased if all lung cell populations had not been correctly extracted and included in the analysis. However, we conducted the study in accordance with standard protocols for lung experiments. Finally, although some gene modulations were integrated into gene networks likely involved in the ASNase treatment stress response in *Gcn2*-deficient rats, in view of severe physiological consequences, other gene alterations could be secondary to this metabolic catastrophe and non-lung tissue failures, and may be difficult to interpret. Therefore, either there was an integrated regulatory system present that we do not yet understand, or several genes were increased due to compromised systemic physiological status. The *Gcn2*-deficient rodent model characterized by a major difference compared with human subjects carrying biallelic *GCN2* deficiency, because severe PVOD usually occurs early in life, even in neonates, despite the absence of an identifiable trigger. We cannot eliminate a specific and unidentified inducing factor involved in humans to which the experimental rats have not been exposed, although we used several conditions to attempt to induce PVOD. Another hypothesis could refer to a specific inflammatory factor involved in the development of vascular remodeling in humans, which could be absent in rodents.

Our results suggest that the activation of the lung's innate immune system in response to metabolic stress in *Gcn2*-deficient rats is the combination of calprotectin-induced TLR pathway activation associated with neutrophil recruitment during apoptosis, and autophagy deficiency.

Importantly, we propose a new role for GCN2 in adaptive immunity involving T cell development under basal conditions, independent to amino acid starvation. These results suggest that GCN2 has an additional role to its amino acid sensor function which should be further investigated.

## REFERENCES

1. Montani D, Lau EM, Dorfmüller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
2. Mandel J, Mark EJ, Hales CA. Pulmonary Veno-occlusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1964–1973.
3. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais M-C, Dorfmüller 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. *The American Journal of Pathology*. 2015;185:356–371.
4. Montani D, Lau EM, Descatha A, Jaïs X, Savale L, Andujar P, Bensefa-Colas L, Girerd B, Zendah I, Le Pavec J, Seferian A, Perros F, Dorfmüller P, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2015;46:1721–1731.
5. Montani D, Achouh L, Dorfmüller P, Le Pavec J, Sztrymf B, Tchérakian C, Rabiller A, Haque R, Sitbon O, Jaïs X, Darteville P, Maître S, Capron F, Musset D, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Clinical, Functional, Radiologic, and Hemodynamic Characteristics and Outcome of 24 Cases Confirmed by Histology. *Medicine*. 2008;87:220–233.
6. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, Chelghoum N, Coulet F, Bonnet D, Dorfmüller P, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Tregouët D-A, Humbert M, Soubrier F. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nature Genetics*. 2013;46:65.
7. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattem KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR. The GCN2 eIF2 Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22:6681–6688.
8. Masson GR. Towards a model of GCN2 activation. *Biochemical Society Transactions*. 2019;47:1481–1488.
9. Manaud G, Nossent EJ, Lambert M, Ghigna M-R, Boët A, Vinhas M-C, 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, Remy S, Anegon I, Bogaard HJ, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Grünberg K, Humbert M, Montani D, Dorfmüller P, Antigny F, Perros F. Comparison of Human and Experimental Pulmonary Veno-Occlusive Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63:118–131.
10. Castilho BA, Shanmugam R, Silva RC, Ramesh R, Himme BM, Sattlegger E. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1948–1968.
11. Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG. Autophosphorylation in the activation loop is

- required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2282–2297.
12. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, Khan RA, Bhat SY, Qureshi IA, Manavathi B, Khan AA, August A, Hasnain SE, Khan N. Amino acid starvation sensing dampens IL-1 $\beta$  production by activating riboclustering and autophagy. *PLoS Biol.* 2018;16:e2005317.
  13. Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, Machiah DK, Lawson B, Hakimpour P, Wang Y, Li S, Sharma P, Kaufman RJ, Martinez J, Pulendran B. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature.* 2016;531:523–527.
  14. Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract. *Biochem Soc Trans.* 2020;48:327–336.
  15. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P. DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. *Gastroenterology.* 2009;137:2179–2180.
  16. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature.* 2018;560:494–498.
  17. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *Journal of Leukocyte Biology.* 2006;79:214–222.
  18. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev.* 2017;276:80–96.
  19. Bae J, Lee SJ, Park C-G, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the Surface on Activated T Cells via Its Cytoplasmic Domain and Protein Kinase C Signaling. *J.* 2014;193:3101–3112.
  20. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 Kinase GCN2 Is Essential for the Murine Immune System to Adapt to Amino Acid Deprivation by Asparaginase1–3. *The Journal of Nutrition.* 2010;140:2020–2027.
  21. Van de Velde L-A, Guo X-ZJ, Barbaric L, Smith AM, Oguin TH, Thomas PG, Murray PJ. Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Reports.* 2016;17:2247–2258.
  22. Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A. Halofuginone Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science.* 2009;324:1334–1338.
  23. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Tsogka K, Sounidaki M, Stefanidis I. Differential effects of the two amino acid sensing systems, the GCN2 kinase

- and the mTOR complex 1, on primary human alloreactive CD4<sup>+</sup> T-cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;37:1412–1420.
24. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*. 2005;22:633–642.
  25. Wilson GJ, Bunpo P, Cundiff JK, Wek RC, Anthony TG. The eukaryotic initiation factor 2 kinase GCN2 protects against hepatotoxicity during asparaginase treatment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;305:E1124–E1133.
  26. Phillipson-Weiner L, Mirek ET, Wang Y, McAuliffe WG, Wek RC, Anthony TG. General control nonderepressible 2 deletion predisposes to asparaginase-associated pancreatitis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016;310:G1061–G1070.
  27. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13:54–61.
  28. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050–1059.
  29. Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, Koritzinsky M, Madaio MP, McGaha TL. 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.
  30. Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ*. 2011;18:1316–1325.
  31. Pruenster M, Kurz ARM, Chung K-J, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, Eggersmann TK, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, Sperandio M. Extracellular MRP8/14 is a regulator of  $\beta$ 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun*. 2015;6:6915.
  32. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260–4268.
  33. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J Immunol*. 2003;170:3233–3242.

34. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, Brissova M, Powers AC, Opdenakker G, Phillipson M. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012;120:4653–4662.
35. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112:1461–1471.
36. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, Luhmann UFO, Lange CAK, Zhai Z, Arthur HM, Bainbridge J, Moss SE, Greenwood J. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- $\beta$  signalling. *Nature*. 2013;499:306–311.
37. Singhal M, Gengenbacher N, Abdul Pari AA, Kamiyama M, Hai L, Kuhn BJ, Kallenberg DM, Kulkarni SR, Camilli C, Preuß SF, Leuchs B, Mogler C, Espinet E, Besemfelder E, Heide D, Heikenwalder M, Sprick MR, Trumpp A, Krijgsveld J, Schlesner M, Hu J, Moss SE, Greenwood J, Augustin HG. Temporal multi-omics identifies LRG1 as a vascular niche instructor of metastasis. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabe6805.
38. 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.
39. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*. 1993;151:6338–6346.
40. Meizlish ML, Franklin RA, Zhou X, Medzhitov R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:557–581.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1. The integrated stress response is induced in WT rat lungs after systemic asparaginase exposure.** (A) Bodyweight loss three days after a single injection of either asparaginase (ASNase; 75 units per kilogram body weight) or physiological serum in both WT rats (WT) and Gcn2 KO rats (Gcn2<sup>-/-</sup>). (B) Pulmonary levels of phospho-GCN2 protein (general control nonderepressible 2; B1), GCN2 (B2), PERK [(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; B3] and ASNS (asparagine synthetase; B4) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and Gcn2<sup>-/-</sup> genotypes. (C) Pulmonary levels of ATF4 (activating transcription factor 4; C1) and Sestrin-2 (C2) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and Gcn2<sup>-/-</sup> genotypes.  $\beta$ -Actin was used as the loading control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$  by two-way ANOVA test, except for B2: Mann-Whitney U test.

**Figure 2. Deficient autophagy and increased apoptosis in lungs from asparaginase-treated Gcn2-deficient rats.** (A) Pulmonary levels of p62 (A1), ATG3 (A2), and LC3B (A3) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and Gcn2<sup>-/-</sup> genotypes. (B) Pulmonary levels of ATG5 were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and Gcn2<sup>-/-</sup> genotypes.  $\beta$ -Actin was used as the loading control. (C) Immunofluorescent TUNEL staining of rat lungs (green, apoptosis marker). To quantify pulmonary apoptosis, the ratio of TUNEL<sup>+</sup> cells per total (DAPI<sup>+</sup>) cell number was calculated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$  by two-way ANOVA test.

**Figure 3. Transcriptional profiling of lungs three days after a single injection of either asparaginase or physiological serum in both wild-type rats (WT) or Gcn2 KO rats (Gcn2<sup>-/-</sup>).** (A) Differentially expressed genes that are significantly either up- or downregulated between all experimental groups. (B) Venn diagram shows the number of genes altered by asparaginase treatment, with 1221 genes categorized as unique to ASNase-treated Gcn2<sup>-/-</sup> rats, 27 genes

unique to ASNase-treated WT rats, and 15 genes common to both ASNase-treated genotypes. (C) Heatmap representation of upregulated genes in asparaginase-treated  $Gcn2^{-/-}$  rats classified by the Hallmark\_inflammatory response gene set in all experiment groups. (D) Hallmark geneset enrichment analysis of asparaginase-treated  $Gcn2^{-/-}$  rats versus asparaginase-treated WT rats showing the most significantly upregulated pathways.

**Figure 4. Asparaginase treatment induces inflammation in  $Gcn2$ -deficient rats ( $Gcn2^{-/-}$ ).** (A) Gene expression of  $Il1\beta$  (B)  $Il6$ , (C)  $Nfkb2$ , (D)  $Ccl2$ , (E)  $Myd88$ , and  $Sele$  (F) in rat lungs measured by RT-qPCR. Each mRNA from a single biological sample was measured in triplicate, normalized to 18S ribosomal RNA, and means of triplicate values are compared. Results were obtained by the comparative Ct method and are expressed as fold change with respect to the experimental control. (G) Calprotectin concentration in the serum measured by ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  by two-way ANOVA test.

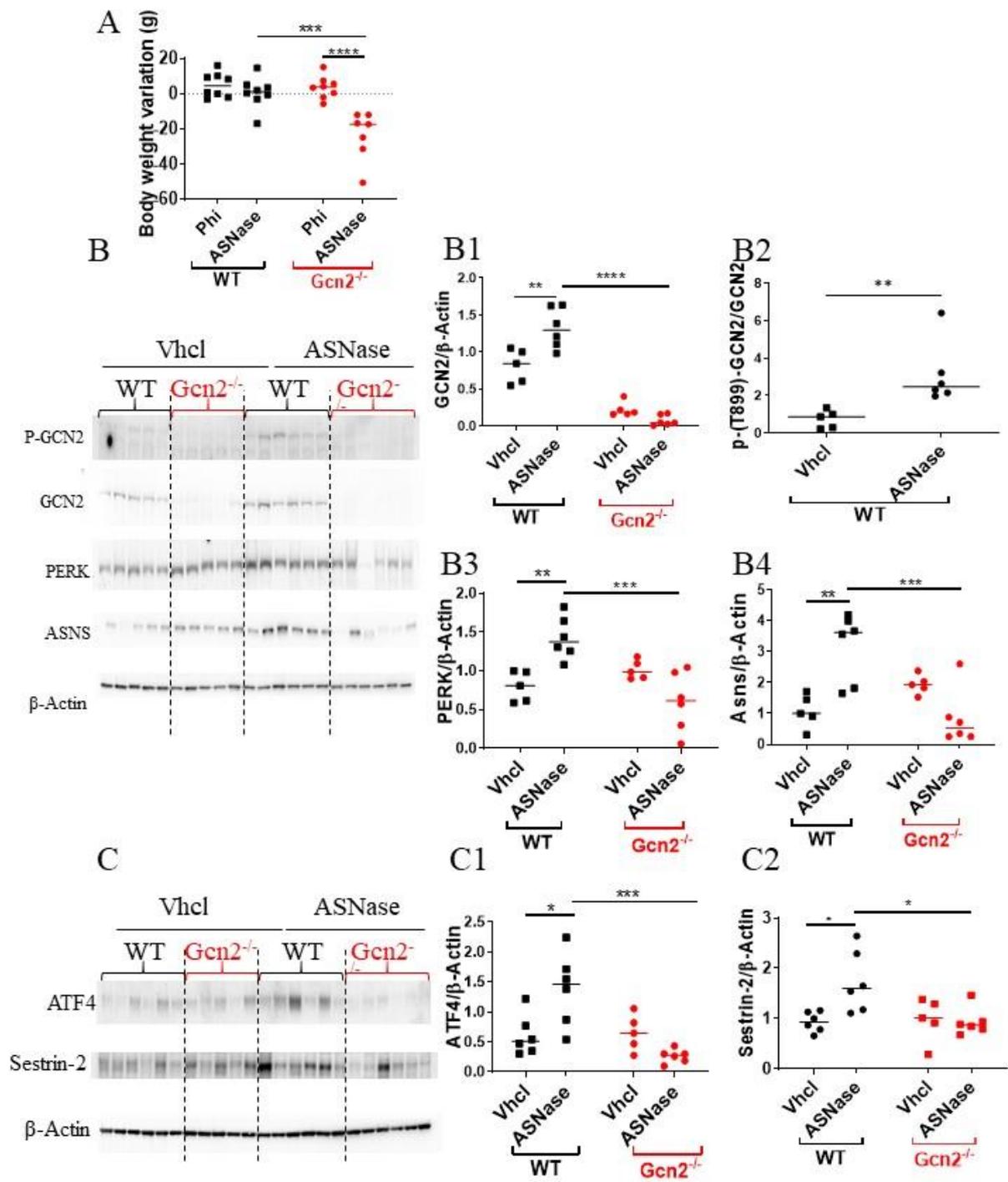
**Figure 5. scRNA-seq identifies different cellular landscapes in the lungs of  $Gcn2$ -deficient rats and WT rats with either asparaginase treatment or under basal conditions.** (A) UMAP projection of 18,201 lung cells from 12 rats showing the formation of 19 clusters. (B) Dot plot displaying average expression of discriminative marker genes was used to identify cell clusters in (A). Dot size corresponds to percentage of cells expressing a gene in the cluster (C). Bar chart highlighting the percentage of cells per sample within each cell type cluster (WT rats treated with asparaginase in blue, WT rats treated with physiological serum in yellow,  $Gcn2$ -deficient rats treated with asparaginase in grey, and  $Gcn2$ -deficient rats treated with physiological serum in orange).

**Figure 6. scRNA-seq reveals unique DEGs in cell types of  $Gcn2^{-/-}$  rats compared to WT rats.** (A) Jitter plot displaying differential gene expression for each cell type of the UMAP projection according to genotype ( $Gcn2^{-/-}$  rats injected with vehicle vs WT rats injected with vehicle) or according to asparaginase treatment and genotype ( $Gcn2^{-/-}$  rats treated with asparaginase vs

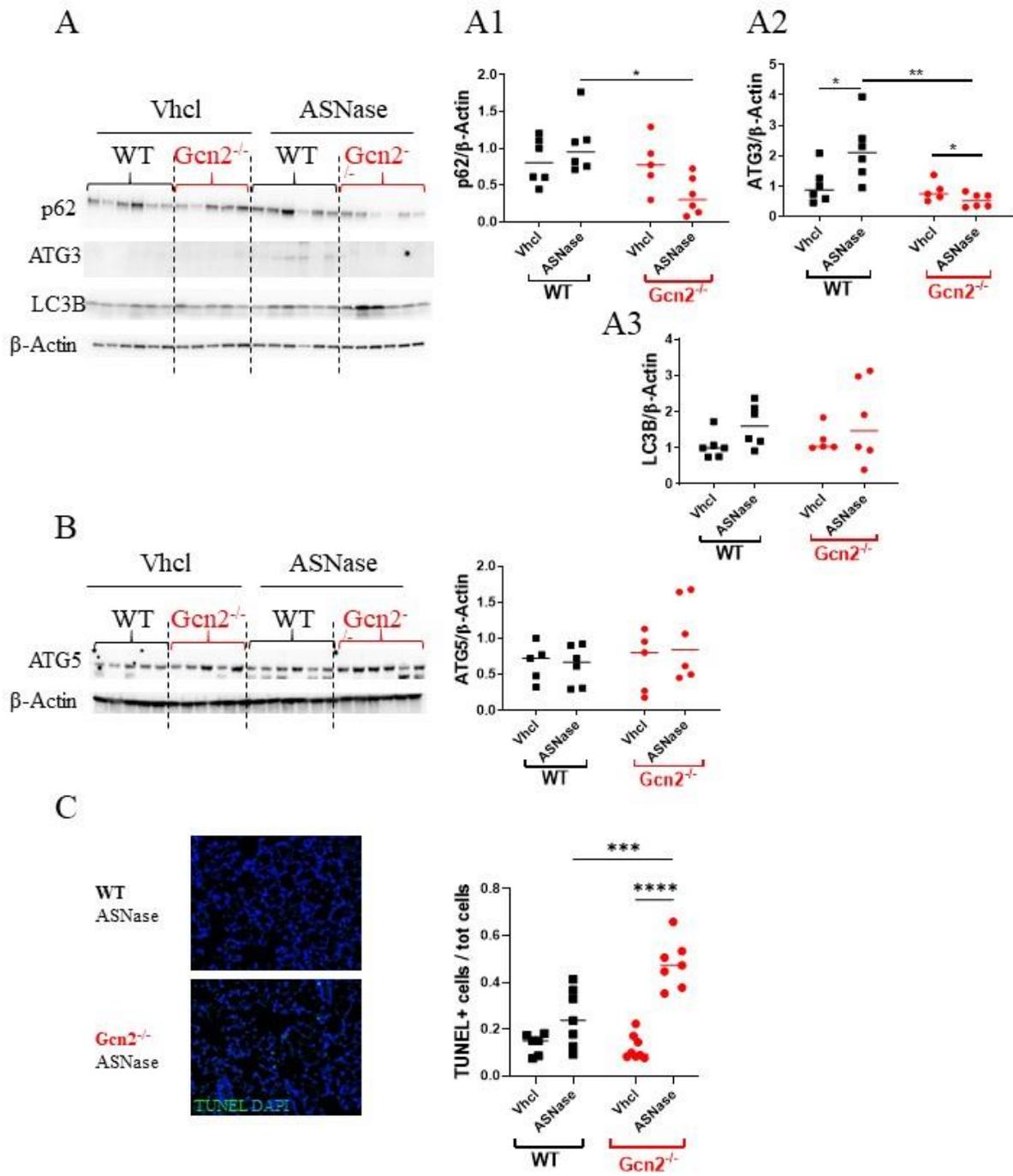
WT rats treated with asparaginase). Each dot represents genes distributed according to the log (fold change) of a gene. Dots with  $FDR < 0.05$  are in color. Grey dots were not significant. (B) Dot plot presenting differentially expressed genes across cell types enabling the identification of genes whose differential expression was specific to an experiment group and a particular cell type. (C) RNA velocity analysis is defined as the time derivative of the gene expression state and is used to predict the future transcriptional state of cells. The arrows represent extrapolated future states.

***Figure 7. Flow cytometry and immunofluorescence validate scRNA-seq cell type identities.***

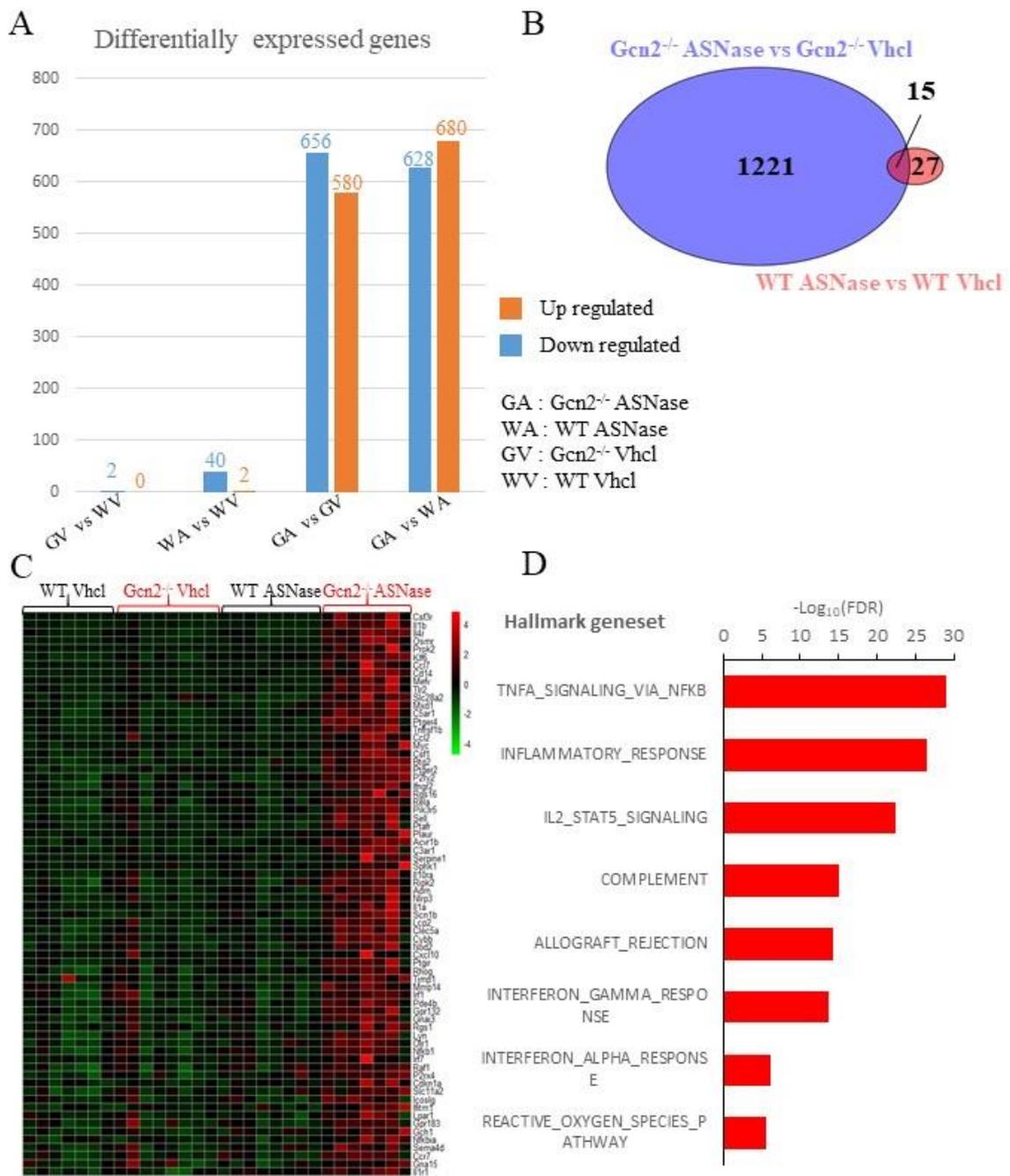
(A) Flow cytometry analysis of pulmonary cells from Gcn2-deficient rats and WT rats under basal conditions confirmed (A1) the increased population of CD3<sup>+</sup> LAG3<sup>+</sup> cells in unstressed Gcn2-deficient rats. This analysis enabled us to confirm that the increase of LAG3<sup>+</sup> T cells occurs in both CD4<sup>+</sup> (A2) and CD8<sup>+</sup> (A3) T cells. (B) Immunofluorescent staining of rat lungs for calprotectin (green) and von Willebrand Factor (vWF; endothelial marker; red). To quantify calprotectin<sup>+</sup> cells, the ratio of calprotectin<sup>+</sup> cells over total (DAPI<sup>+</sup>) cells was calculated. (C) Pulmonary levels of MMP9 were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats for both WT and Gcn2<sup>-/-</sup> genotypes.  $\beta$ -Actin was used as the loading control. (D) Immunofluorescent staining of rat lungs for Ki67 (proliferation marker; green) and CD3 (lymphocyte T cell marker; red). To quantify proliferating CD3<sup>+</sup> cells, the ratio of double-positive Ki67<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> cells over total cells was calculated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  by two-way ANOVA test, except for (A1), (A2), and (A3): Mann Whitney U test.



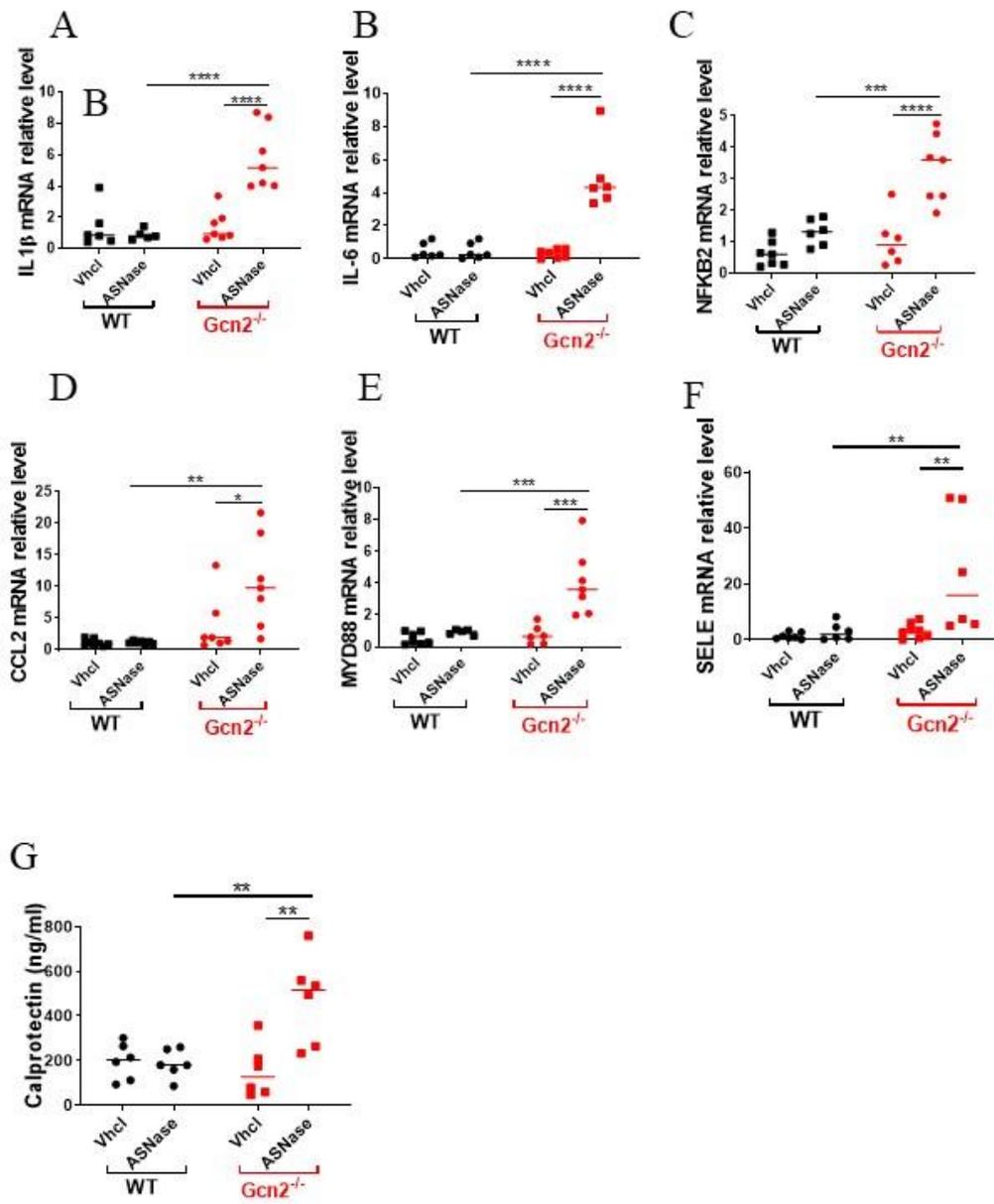
**Figure 1**



**Figure 2**

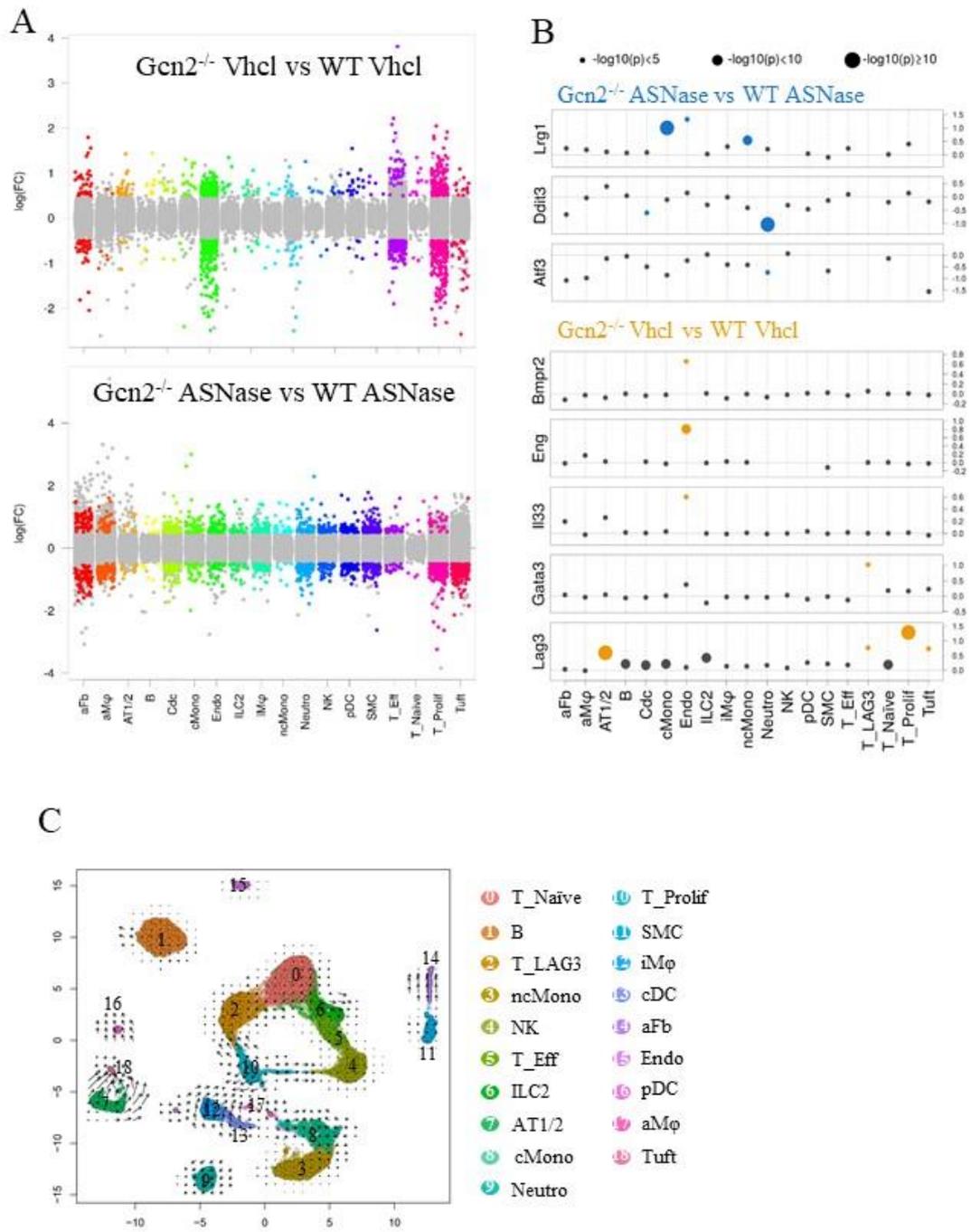


**Figure 3**

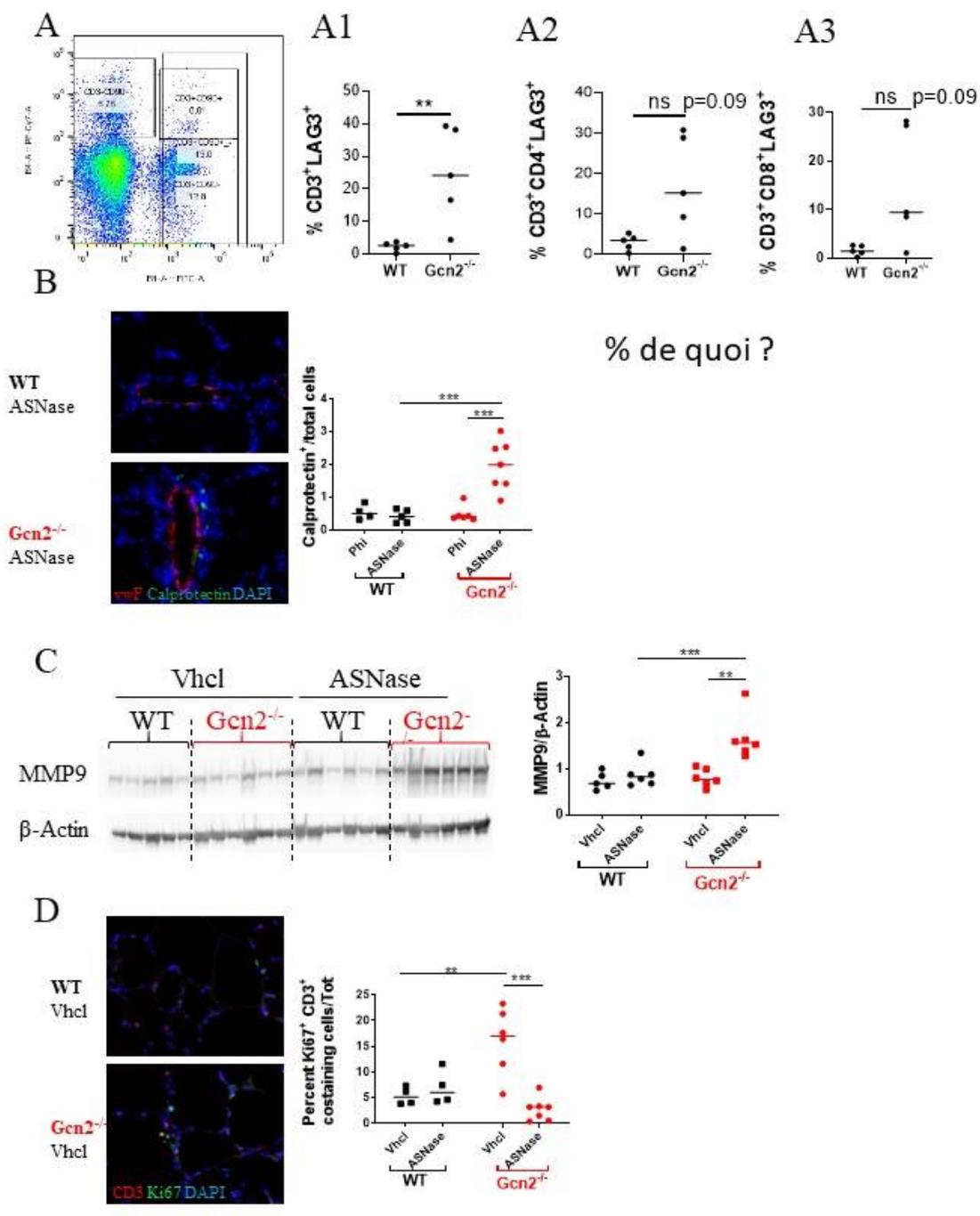


**Figure 4**





**Figure 6**



**Figure 7**

***Gcn2* deficient rat display lung molecular and cellular dysregulation in basal and stress conditions**

Juliette Bignard, Fabrice Atassi, Olivier Claude, Maria-Rosa Ghigna, Nathalie Mougenot, Bahgat Soilih Abdoukarim, Florence Deknuydt, Aurélie Gestin, David Montani, Sophie Nadaud, Florent Soubrier, Frédéric Perros

## Methods

**Animals** - Rats were housed at the Sorbonne-University (SU) animal core facility. The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N°B751320). This study was approved by the Animal Experiments Ethics Committee (authorization N°APAFIS#20355-2019042316587189v5). All efforts were made to minimize animal suffering. The rats were housed in a controlled environment (temperature  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12-h light/dark cycle).

**Histopathology** – Paraformaldehyde-fixed histological samples were embedded in paraffin, and serial sections of 5  $\mu\text{m}$  were obtained from lung tissues. Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) staining. Lung samples from all rats were retrospectively analyzed in a blinded fashion by conventional light microscopy.

**Western blots** – Proteins from rats' lung-tissues were extracted in lysis buffer containing 1% Igepal®, 20 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , leupeptin 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , pepstatin 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , aprotinin 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , and a protease-inhibitor cocktail (aprotinin, leupeptin, and Pefabloc® [Roche]). A total of 50  $\mu\text{g}$  of protein were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking, membranes were incubated in 5% BSA in TBS 0.1% Tween-20 overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with primary antibodies –described in the table E3. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:1000 (Bio-technie) or with HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:1000 (Bio-technie). Immuno-reactive bands were revealed using ECL reagents (Biorad). Image-J Software was used to quantify the level of protein expression.

**Immunofluorescence labeling** – Cryosections of 10  $\mu\text{m}$  thickness were fixed in formalin (10 min at RT). They were then permeabilized in methanol/acetone (1:1) (10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Nonspecific binding was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) and 10% goat serum in PBS (1 h at RT) and sections were incubated with primary antibodies diluted in 5% BSA and 3% goat serum described in Table E3 overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Secondary antibodies (anti-mouse or

anti-rabbit fluorophore-coupled, depending on the antigen tested) were diluted in 5% BSA and 3% goat serum and incubated 1 h at room temperature (RT). Immunolabeled sections were mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako) and examined under a confocal microscope (Leica SPE confocal microscope). Control sections were stained by omitting primary antibodies and did not show labeling. For positive cell counting, images were analyzed by an investigator blinded to the experimental status of animals. A total of 20 to 40 fields were analyzed per animal.

***RNA preparation and RNAseq analysis*** - Total RNA was extracted from frozen lung samples using the mirVANA extraction kit (Invitrogen) followed by DNase treatment. RNA quality was assessed on TapeStation (Agilent technologies) and only samples with an RNA Integrity Number (RIN) > 6 were used. cDNA libraries were constructed with 100 ng total RNA input following the manufacturer's recommendations (KAPA mRNA Hyper Prep from Roche). Raw data quality was evaluated with FastQC. Poor quality sequences were trimmed or removed with the fastp tool using default parameters. The Illumina DRAGEN bio-IT platform (v3.7.5) was used for mapping onto the Rnor\_6.0 reference genome and quantified with the gencode v32 annotation gtf file. Library orientation, library composition, and coverage along transcripts were checked with Picard tools. Analyses were conducted with R software. Data were normalized with DESeq2 (v1.26.0) bioconductor packages, prior to differential analysis with the DESeq2 workflow. Multiple hypotheses adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Finally, enrichment analysis was conducted using the clusterProfiler R package (v3.14.3) with Gene Set Enrichment Analysis, with gene ontology database and KEGG pathways.

***scRNA-Seq data analyses*** - Sequencing data quality analysis was performed using FastQC v0.11.2 on four rat samples. For read alignment and unique molecular identifiers (UMI) quantification, CellRanger software v3.0.2 was used with the *Rattus Norvegicus* genome

Rnor\_06 with default parameters and gene annotation from Ensembl 100. The four expression matrices containing UMI counts were merged, and only the genes with  $UMI \geq 1$  in at least one cell were kept. The following filters were applied to generate a global matrix used in further analysis: cells with  $UMI \geq 2000$ , number of detected genes  $\geq 800$ , and cells with UMI in mitochondrial genes  $\leq 10\%$ . For UMIs normalization, Seurat 3.1.1 was used<sup>1</sup>, and global-scaling normalization method was applied with a scale factor of 10,000 and log-transformation of data. This was followed by a scaling linear transformation step, to avoid highly-expressed genes having higher weight in downstream analysis.

**Clustering and marker genes** - PCA was performed on the scaled data, with a Jackstraw plot to choose how many principal components (PCs) to retain as an input for the Seurat clustering step. The clustering step was performed using default parameters, with the Louvain algorithm as the clustering method, 10 PCs and a resolution parameter defining the clusters granularity set to 0.6.

Marker genes defining each cluster were found via differential expression testing, with a Wilcoxon rank sum test and a log fold change threshold of 1.

**Trajectory analysis of scRNAseq data**- Monocle-2 single-cell trajectory was constructed using M3Drop<sup>2</sup> and Monocle 2.10.1<sup>3</sup>. Input genes for Monocle trajectory construction were selected using an unsupervised approach via M3Drop result, which identifies differentially expressed genes based on a Michaelis-Menten function for the relationship between mean expression and dropout rate, the relevant genes being those shifting above a fitted curve. The default Monocle workflow was then performed to generate the trajectories. For RNA Velocity<sup>4</sup>, spliced and unspliced expression matrices were generated using the standard Velocyto pipeline. Loom files were merged using the loompy package on Python. R packages velocity.R and SeuratWrappers were then used to estimate RNA velocity vectors with velocity parameters  $kCells = 25$ ,

fit.quantile = 0.2 and deltaT = 1, and visualization parameters n = 200, grid.n = 40, arrow.scale = 3, and scale = "sqrt."

**Enrichment analysis** - Analysis for enriched GO terms, KEGG pathways, and REACTOME pathways were performed using the WebGestaltR package<sup>5</sup>, on databases from the *Mus musculus* organism. GO terms and pathways were considered as enriched if fold enrichment  $\geq 2.0$ , uncorrected p-value  $\leq 0.05$ , and the minimum number of regulated genes in pathway/term  $\geq 2.0$ .

**mRNA expression levels by Real Time Quantitative PCR** - Total RNA was extracted as described above. A total of 1  $\mu\text{g}$  of purified RNA was reverse transcribed using the M-MLV cDNA Reverse Transcription kit (Invitrogen). Relative mRNA expression levels were determined by quantitative PCR using Brilliant III-ultra-fast-SYBR green-qPCR kit (Agilent) on a Lightcycler 480. Each mRNA from a single biological sample was measured in triplicate and normalized to 18S ribosomal RNA. Results were obtained by the comparative Ct method and are expressed as fold change with respect to the experimental control. All primer/probe assays were ordered from Eurogentec. Primer sequences are shown in Table E4.

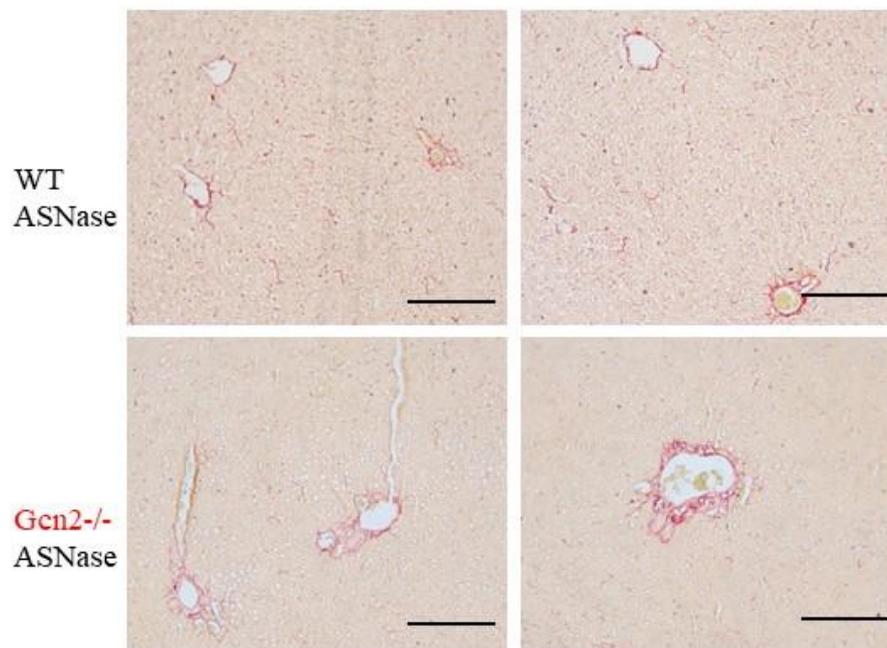
**ELISA** Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed using kits from Fine Biotech for calprotectin according to the manufacturer's instructions. The plates were read using a Flexstation 3 microplate reader at a wavelength of 450 nm.

**T cell characterization by flow cytometry** - Rats were euthanized and after exsanguination, lungs were washed in cold PBS and cut into small pieces (2–3 mm<sup>3</sup>). The multi-Tissue Dissociation Kit 2 (Miltenyi biotec) was used in combination with the gentle MACS Dissociator (Miltenyi biotec) according to the manufacturer's instructions. Tissues were passed through a 70- $\mu\text{m}$  cell strainer and washed in 5% HBSS-BSA. Cells were then incubated for 1 min with red blood cell lysis buffer (RBCL, Invitrogen). Isolated rat lung cells were surface stained for 10 min on ice in the dark. Antibodies used were CD3 Viobright B515, CD4 PerCPVio700, and

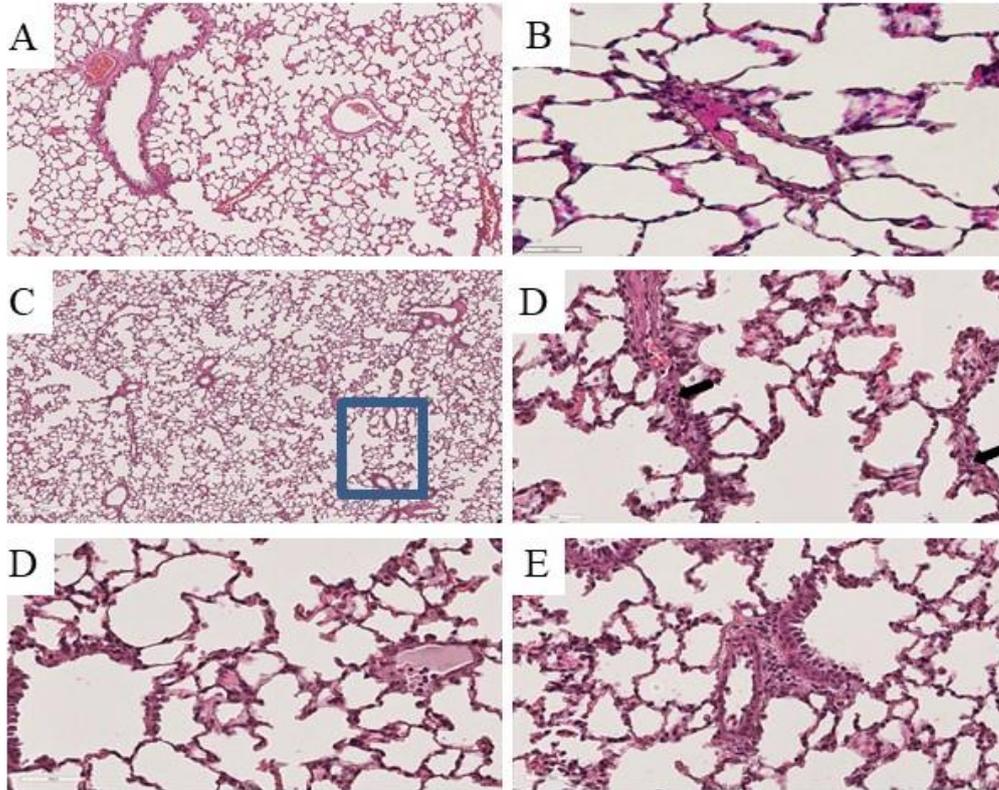
CD8b APC-Vio770. Viability Fixable Dye Vioblue (Miltenyi biotec) was used on lung cells as a viability cell marker. All the antibodies are described in Table E3. After 30 min fixation with 1% paraformaldehyde, cells were washed with PBS and centrifuged for 5 min at 300g at 4°C. We realized 20 min of permeabilization (0.15% saponin in PBS), and then stained with LAG3 conjugated with PE (phycoerythrin). After washing twice with PBS, all stained cells were resuspended in PBS and acquired by flow cytometry using a MACSQUANT 10 (Miltenyi Biotech) and the results analyzed on FLOWJOX software.

## References

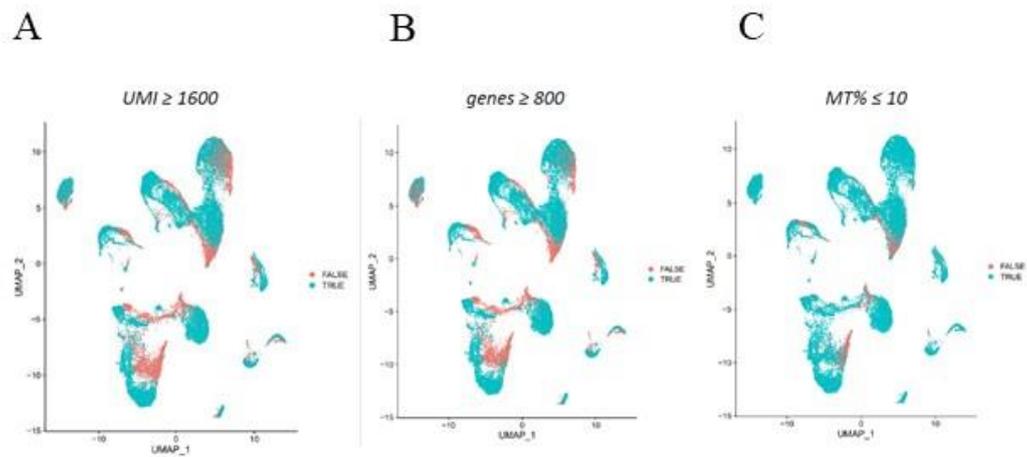
1. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol.* 2018;36:411–420.
2. Andrews TS, Hemberg M. M3Drop: dropout-based feature selection for scRNASeq. *Bioinformatics.* 2019;35:2865–2867.
3. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, Trapnell C. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods.* 2017;14:979–982.
4. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature.* 2018;560:494–498.
5. Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W130–W137.



**Supplemental Figure E1. Histopathology of asparaginase-induced liver injury in *Gcn2*-deficient rats.** Sirius red stain, 20× magnification. Vacuoles were observed in livers of asparaginase-treated *Gcn2*-deficient rats. These lesions were not observed in asparaginase-treated WT rats. Scale: 100 μm.



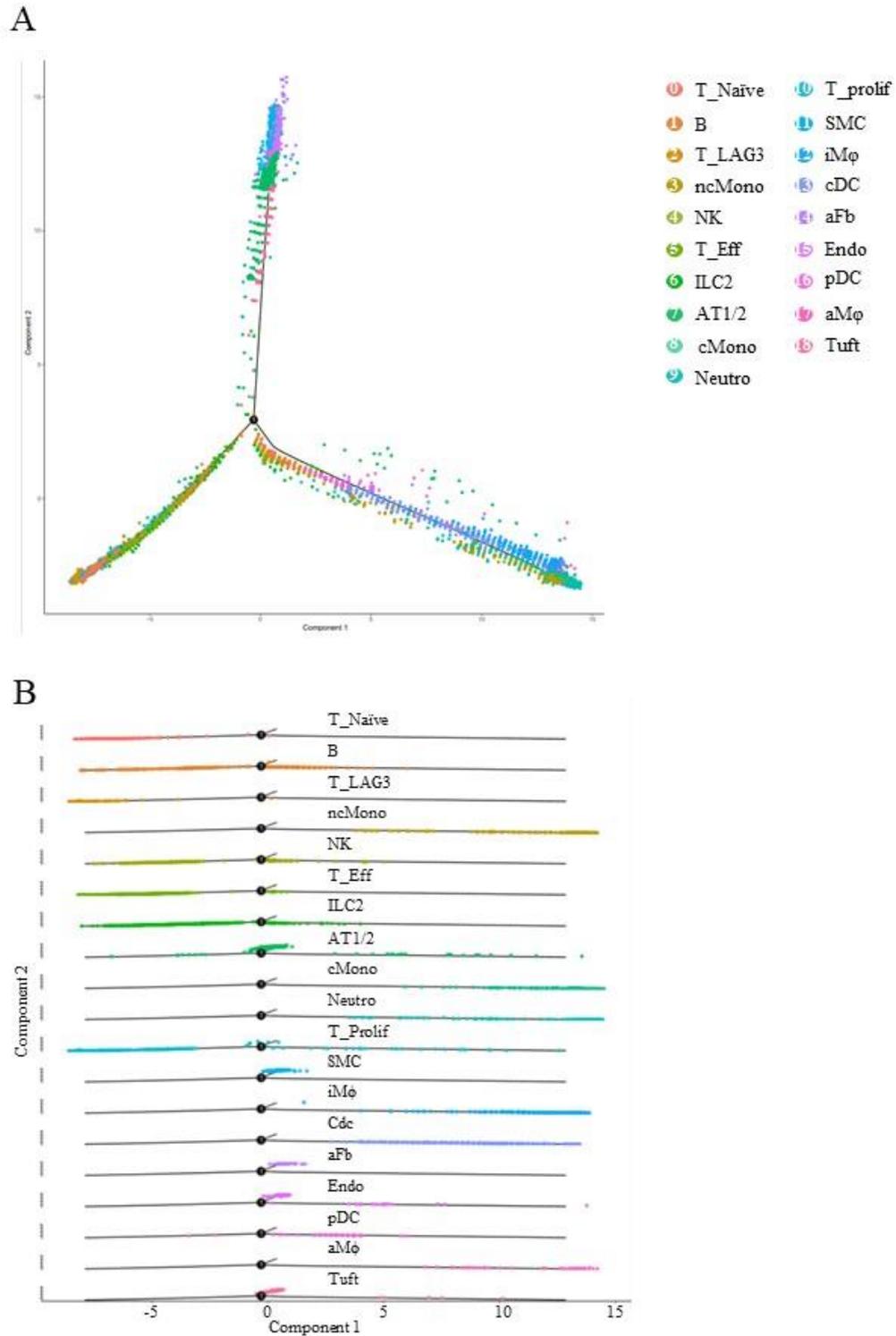
**Supplemental figure E2 : Asparaginase induces inflammation in the *Gcn2*<sup>-/-</sup> rat lungs, with significant perivascular cells infiltration and granulocytes involvement (A-B) Lungs of WT ASNase displaying normal architecture and vessels. Alveolar spaces are uniform in shape, as well as airways and vessels. No significant inflammatory infiltrate is noticed within interstitium or around bronchial or vascular structures. (C) Lung parenchyma of *Gcn2*<sup>-/-</sup> ASNase appears more cellular without architectural alteration. Airways and bronchi are uniform, without structural changes. Increased cellularity is noticed in the interstitial compartment and around and within vessels and airways. (D-E) Pulmonary vessel carrying inflammatory infiltration. It is mainly constituted by granulocytes (arrows). No significant vascular remodeling is noticed.**



D

Sample	Cells not passing thresholds	Cells passing thresholds	% cells passing thresholds
WT Vhcl	1604	6927	81,20%
WT ASNase	692	1304	65,30%
Gcn2 <sup>-/-</sup> Vhcl	2698	6240	69,80%
Gcn2 <sup>-/-</sup> ASNase	639	1218	65,60%

**Supplemental Figure E3 scRNA-seq quality control.** UMAP showing the 18,201 cells filtered by (A) UMI (Unique Molecular Identifiers)  $\geq 1600$ , (B) number of genes  $\geq 800$ , and (C) fraction of mitochondrial genes  $\leq 10$  detected per cell. (D) Number and percentage of filtered cells for each sample.



**Supplemental Figure E4. The ordering of lung cells in a two-dimensional state-space defined by Monocle-2.** Monocle-2 arranged cells along a pseudo-time axis to indicate their position in the transition state. (A) The resulting trajectory has three states and one branch point. All the cells from every cluster were distributed according to their pseudo-time trajectory. (B) 3D representation of cell trajectory for each cluster with three states and one branch per cluster.

Gene	Log <sub>2</sub> (FC)	FDR
IL6	6,95703244	9,95E-15
IL1B	2,75783596	1,29E-20
MYD88	1,32842492	1,23E-23
TLR2	2,11656774	5,16E-10
TLR9	1,27571497	8,27E-03
TLR10	2,22275414	9,61E-07
TLR11	1,73250092	6,44E-04
S100A8	4,80426536	1,45E-30
S100A9	4,40421913	1,41E-28
SELE	3,30863971	1,23E-14

**Supplemental table E1. List of differentially expressed genes between Gcn2<sup>-/-</sup> ASNase and WT ASNase involved in TLR pathway. FC :Fold change. FDR : False Discovery Rate**

Pathway Description (KEGG)	Nb Genes in Pathway	Nb Regulated Genes (Up / Down)	P-Value (All)	P-Value (Up)	P-Value (Down)	Min P-Value	min FDR
Estrogen signaling pathway	133	7 (5/2)	1,26E-03	2,75E-05	3,64E-01	2,75E-05	5,55E-03
Ribosome	179	9 (0/9)	3,67E-04	NA	5,64E-05	5,64E-05	3,80E-02
Protein processing in endoplasmic reticulum	164	9 (5/4)	1,92E-04	7,49E-05	7,27E-02	7,49E-05	1,01E-02
Mitophagy	65	6 (2/4)	1,42E-04	1,32E-02	3,47E-03	1,42E-04	2,86E-02
Th17 cell differentiation	109	5 (4/1)	1,10E-02	2,05E-04	6,51E-01	2,05E-04	2,00E-02
Human immunodeficiency virus 1 infection	243	11 (4/7)	2,08E-04	4,03E-03	8,93E-03	2,08E-04	3,45E-02
RNA transport	168	8 (0/8)	1,10E-03	NA	2,13E-04	2,13E-04	6,23E-02
Antigen processing and presentation	101	7 (3/4)	2,43E-04	2,51E-03	1,61E-02	2,43E-04	3,80E-02
Pathways in cancer	533	11 (7/4)	6,41E-02	4,99E-04	7,55E-01	4,99E-04	3,52E-02
Cellular senescence	189	9 (3/6)	5,45E-04	1,42E-02	9,70E-03	5,45E-04	4,68E-02
Endocytosis	275	11 (5/6)	5,94E-04	8,17E-04	4,89E-02	5,94E-04	4,68E-02
Fluid shear stress and atherosclerosis	152	7 (4/3)	2,71E-03	7,25E-04	1,78E-01	7,25E-04	4,55E-02
Glioma	71	4 (3/1)	1,12E-02	9,11E-04	4,95E-01	9,11E-04	5,04E-02
p53 signaling pathway	74	3 (3/0)	6,24E-02	1,03E-03	NA	1,03E-03	5,20E-02
Herpes simplex infection	219	9 (1/8)	1,54E-03	4,48E-01	1,23E-03	1,23E-03	7,50E-02
Hepatocellular carcinoma	180	7 (4/3)	6,80E-03	1,36E-03	2,48E-01	1,36E-03	5,81E-02
Alzheimer disease	185	5 (4/1)	7,76E-02	1,50E-03	8,33E-01	1,50E-03	6,15E-02
Cytosolic DNA-sensing pathway	56	4 (0/4)	4,89E-03	NA	2,01E-03	2,01E-03	1,59E-01
Phototransduction	26	2 (2/0)	4,01E-02	2,20E-03	NA	2,20E-03	7,67E-02

Supplemental table E2. KEGG analysis on differentially expressed genes from population T\_LAG3 between *Gcn2<sup>-/-</sup> Vhcl* and *WT Vhcl* animals

Western Blot						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
p-GCN2		Rabbit		Abcam	ab75836	1/1000
GCN2		Rabbit		Cell signaling technology	3302	1/1000
PERK		Rabbit	C33E10	Cell signaling technology	3192	1/1000
ATF4		Rabbit	D4B8	Cell signaling technology	11815	1/1000
Asns		Rabbit	E6C2C	Cell signaling technology	92479	1/1000
p62		Rabbit		Abcam	ab56416	1/1000
ATG5		Rabbit	D5F5U	Cell signaling technology	12994	1/1000
ATG3		Rabbit		Cell signaling technology	3415	1/1000
LC3B		Rabbit		Cell signaling technology	2775	1/1000
MMP9		Rabbit		Abcam	ab76003	1/1000
$\beta$ -actin		Mouse		Abcam	ab8227	1/1000

Immunofluorescence						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
Calprotectin		Mouse	MAC387	Invitrogen	MA181381	1/100
vwF		Rabbit		Dako	A0082	1/500
Ki67		mouse	B56	Abcam	ab279653	1/500
CD3		Rabbit	SP7	Abcam	ab16669	1/100
DAPI				Sigma-aldrich	MBD0015	1/1000

Flow cytometry						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
CD3	Viobright B515	Human	REA223	Miltenyi	130-127-365	1/200
CD4	PerCPVio700	Human	REA482	Miltenyi	130-107-627	1/50
CD8b	APC-Vio770	Human	REA222	Miltenyi	130-102-686	1/50
LAG3	PE	Rat	C9B7W	eBiosciences	12-2231-82	1/10
Viobility Fixable Dye	Vioblue			Miltenyi	130-110-205	1/100

**Supplemental table E3. Antibodies used for Western blot, Immunofluorescence and flow cytometry**

Gene	Primer forward	Primer reverse
IL1 $\beta$	GGCATAACAGGCTCATCTGG	ATCTTTTGGGGTCTGTCAGC
IL6	GACAAAGCCAGAGTCATTCAGA	TCCTTAGCCACTCCTTCTGTG
SELE	CCTCGTGCTTTCTCTCTGCT	CCCGTTGACAATACGCACTT
NFKB2	CGTTGCTACGATCCAGGTTT	GCTGTTCCACAATCACCAGA
CCL2	AGCATCCACGTGCTGTCTC	GATCATCTTGCCAGTGAATGAG
MYD88	GAGATCCGCGAGTTTGAGAC	CTGTTTCTGCTGGTTGCGTA
18S	CATTCGAACGTCTGCCCTAT	GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC

**Supplemental table E4. Primers sequences for real-time RT-qPCR experiments.**

## Projet n°2 : Similitudes et différences entre la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hypertension artérielle pulmonaire

### Introduction

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est soit sporadique, principalement due à l'exposition au tabac ou à la chimiothérapie par agents alkylants, soit héréditaire (MVOPh) liée à des mutations bialléliques du gène *EIF2AK4*. Cette maladie vasculaire pulmonaire appartient au groupe 1.6 de l'HTAP, qui comprend l'HTAP avec des caractéristiques manifestes d'atteinte veineuse/capillaire<sup>168</sup>. La MVOPh est une maladie autosomique récessive et l'âge de déclenchement de la maladie est beaucoup plus jeune que dans les formes sporadiques (26 ans pour les formes héréditaires contre 60 ans pour les formes sporadiques)<sup>203</sup>. La MVOP est caractérisée par un remodelage vasculaire prédominant sur les veines et les veinules avec la présence d'une fibrose intimale, d'une hypertrophie de la media et d'une hyperplasie musculaire des veines septales interlobulaires. Un remodelage artériel et une musculation microvasculaire sont également observés<sup>367</sup>. Des foyers ressemblant à de l'hémangiomasose capillaire (HCP) sont également présents et expliquent le terme d'hémangiomasose capillaire pulmonaire<sup>368</sup>. L'évolution est extrêmement sévère et les traitements utilisés dans l'HTAP sont contre-indiqués en raison de leurs effets indésirables graves. Le problème est que, cliniquement, la PVOD peut être diagnostiquée à tort comme une HTAP car il n'y a pas de différence hémodynamique. Il est donc urgent de trouver des marqueurs permettant de différencier la MVOP de l'HTAP. Pour cela, nous avons analysé, par RNAseq, le profil transcriptomique des patients atteints de MVOP héréditaire et d'HTAP idiopathique. Les résultats obtenus sur les patients malades ont été comparés avec des échantillons de poumons contrôles. Le but de cette analyse transcriptomique est d'étudier les différences et les similitudes entre les deux maladies et d'explorer les mécanismes physiopathologiques de la MVOP liés à la perte de fonction de *EIF2AK4*.

## Méthodes

- Tissus pulmonaires

Les tissus pulmonaires ont été congelés après explantation précédant la transplantation pulmonaire chez les patients atteints de MVOP héréditaire (MVOPh) (n=4) ou d'HTAP idiopathique (HTAPi) (n=4). Le statut génotypique des patients pour *EIF2AK4* a été obtenu auprès du laboratoire clinique après consentement écrit des patients. Tous les patients du groupe MVOPh étaient porteurs de mutations bi-alléliques de perte de fonction de *EIF2AK4*. Un groupe de tissus sains a également été utilisé comme contrôle (n=6).

- Analyse du transcriptome par RNA seq et qPCR

L'ARN total a été extrait des poumons congelés à l'aide du kit d'extraction mirVANA (Invitrogen), suivi d'un traitement à la DNase. La qualité de l'ARN a été évaluée sur TapeStation (Agilent technologies) avec un score d'intégrité de l'ARN (NIR) > 6. La préparation des bibliothèques d'ADNc (KAPA mRNA Hyper Prep de ROCHE) a été réalisée avec 100ng d'ARN total. Les échantillons finaux, regroupés en pools après marquage avec des index individus-spécifiques, ont été séquencés sur Novaseq 6000 ILLUMINA, permettant d'obtenir 2x50 millions de lectures de 100 bases par échantillon après démultiplexage. La qualité des données brutes a été évaluée avec FastQC. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R. Les données ont été normalisées avec les paquets bioconductor DESeq2 (v1.26.0), avant l'analyse différentielle avec le workflow DESeq2. Les p-values ajustées aux hypothèses multiples ont été calculées avec la procédure de Benjamini-Hochberg pour contrôler le FDR. Lors d'une analyse différentielle entre deux groupes expérimentaux, l'expression d'un gène est significative lorsque son FDR est inférieur à 0,05. De plus un gène est considéré comme régulé à la hausse lorsque le logarithme en base 2 du fold-change est supérieur à 1 et régulé à la baisse quand le logarithme en base 2 du fold-change est inférieur à 1. Enfin, une analyse d'enrichissement a été réalisée grâce au programme Gene Set Enrichment Analysis, avec la collection Hallmark et la collection Human Phenotype Ontology issues de la base de données Molecular Signatures Data Base (MSigDB). Certains gènes identifiés par RNAseq ont été vérifiés par RT-qPCR.

- Western blots

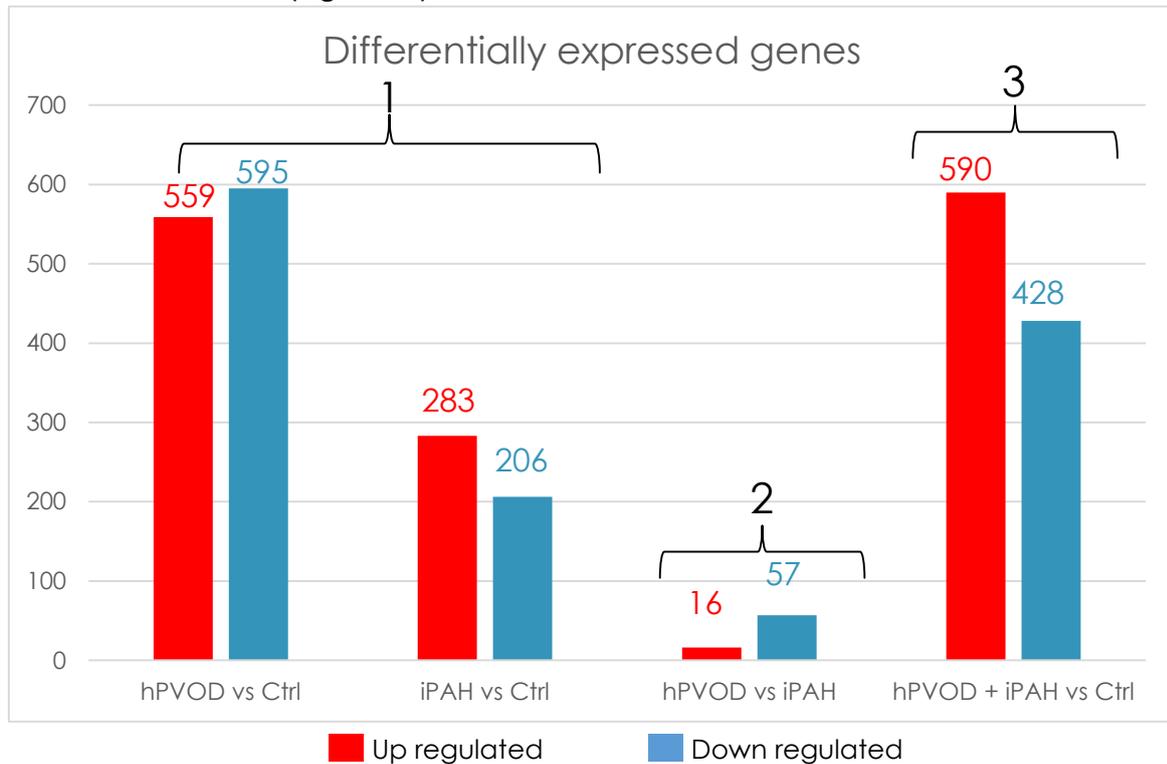
Les protéines des tissus pulmonaires humains ont été extraites dans un tampon de lyse contenant 1% d'Igepal<sup>®</sup>, 20 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 10% de glycérol, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, leupeptine 10 µg/µL, pepstatine 10 µg/µL, aprotinine 10 µg/µL et un cocktail d'inhibiteurs de protéase (aprotinine, leupeptine et Pefabloc<sup>®</sup> [Roche, Meylan, France]). 50 µg de protéines ont été séparés sur SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage avec de la BSA 5%, les membranes ont été incubées avec un anticorps primaire dirigé contre le rat pendant une nuit à 4 °C. Les membranes ont été incubées avec de la peroxydase de raifort conjuguée à l'anticorps secondaire (Anti-lapin ou anti-souris). Les bandes immuno-réactives ont été révélées à l'aide des réactifs ECL (Biorad). Le logiciel Image J a été utilisé pour quantifier l'intensité des bandes dans les Western blots.

## Résultats

Trois groupes de patients ont été étudiés : un groupe MVOPh (n=4), un groupe HTAPh (n=4) et un groupe témoin issu de donneurs de poumons humains sains (n=6). MVOPh regroupe quatre porteurs de la mutation *EIF2AK4* présentant une forme héréditaire de MVOP, HTAPi regroupe quatre patients présentant une forme idiopathique d'HTAP sans mutation génétique connue comme responsable du développement de l'HTAP.

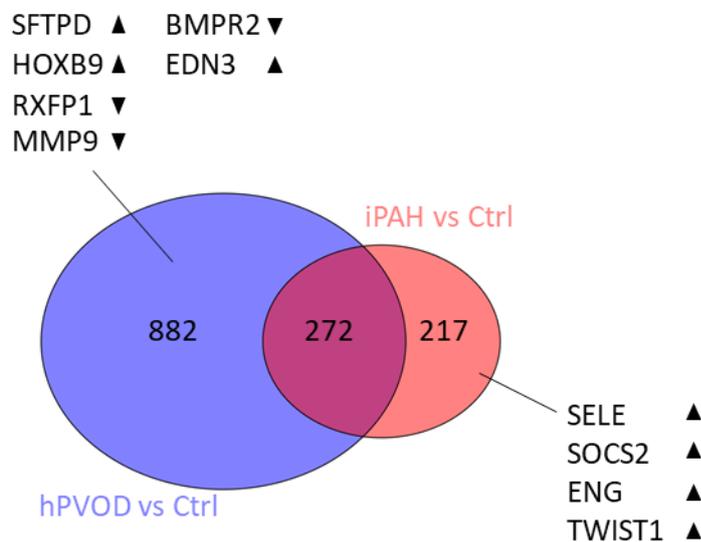
Afin d'explorer les mécanismes mis en place chez les patients MVOPh et d'identifier des différences et les similitudes moléculaires entre l'HTAPi et la MVOPh, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq sur tous les échantillons.

Les analyses différentielles entre les groupes expérimentaux ont été réalisées de trois manières différentes (Figure 40).



**Figure 40 : Le nombre de gène différentiellement exprimés en fonction du type d'analyse différentielle réalisée entre les groupes expérimentaux**

1- La première analyse est la comparaison entre les valeurs d'expression des gènes pour les échantillons de chaque entité pathologique et celles des échantillons de contrôles sains : MVOPh vs Ctrl et HTAPi vs Ctrl. L'analyse différentielle entre les groupes MVOPh et Ctrl a mis en évidence un total de 559 gènes régulés à la hausse et 595 régulés à la baisse dans les poumons des patients MVOPh par rapport aux poumons contrôles. Le nombre de gènes différentiellement exprimés est plus faible pour la comparaison HTAPi vs Ctrl avec un total de 283 gènes régulés à la hausse et 206 régulés à la baisse dans les poumons HTAPi par rapport aux poumons contrôles. L'analyse transcriptomique des explants pulmonaires des patients MVOPh et d'HTAPi a révélé une augmentation de 882 gènes uniques au MVOPh et 217 unique aux HTAPi (Figure 41).



**Figure 41 : Diagramme de Venn comparant les analyses différentielles des MVOPh et des HTAPi contre les contrôles**

Les différences d'expression de certains gènes ont été confirmées par RT-qPCR. Nous avons ainsi validé la baisse d'expression génique de MMP9, spécifique des échantillons MVOPh ainsi que l'augmentation d'expression génique de SOCS2, spécifique des échantillons HTAPi (Figure 42).

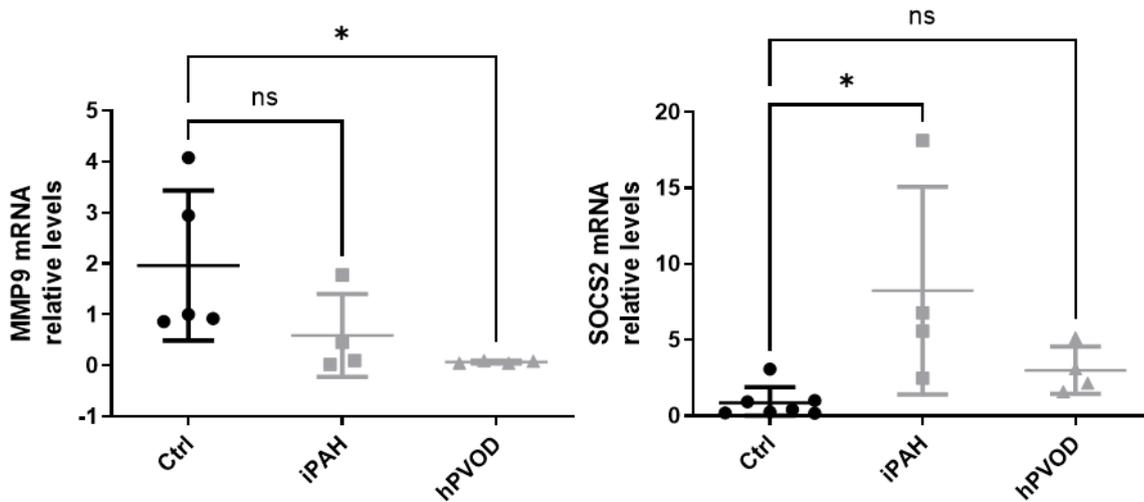


Figure 42 : Expressions des gènes MMP9 et SOCS2 mesurées par RT-qPCR

\* $p < 0.05$  ; ns : non statistique ; par un test Mann Whitney

A l'échelle protéique, le western blot a permis de confirmer la baisse d'expression de la protéine MMP9 chez les patients MVOPh uniquement et l'augmentation de la selectine E chez les patients HTAPI uniquement (Figure 43).

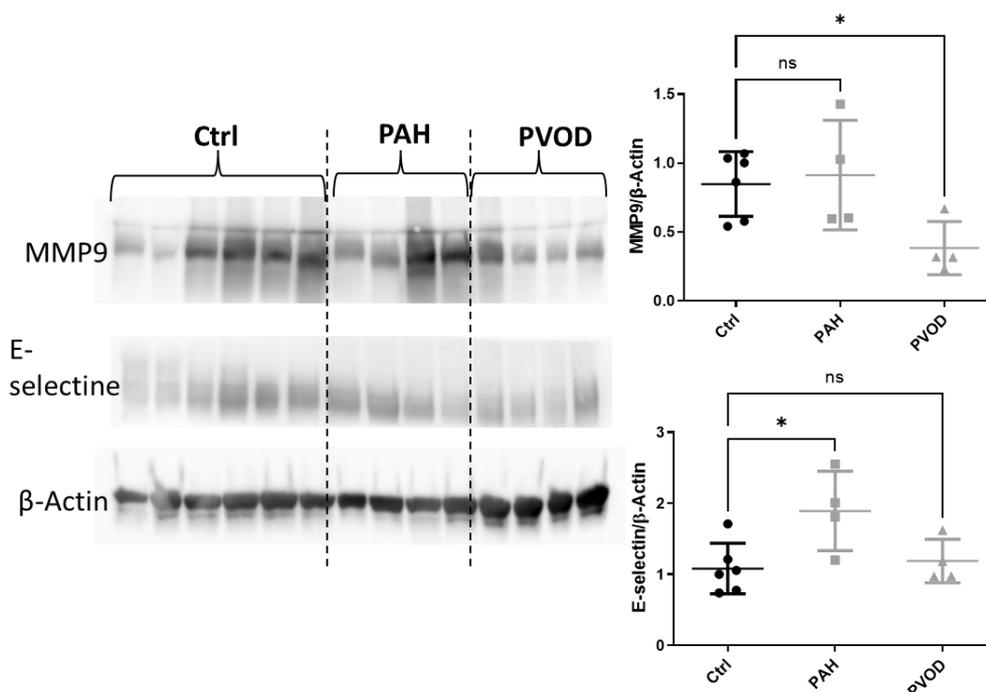
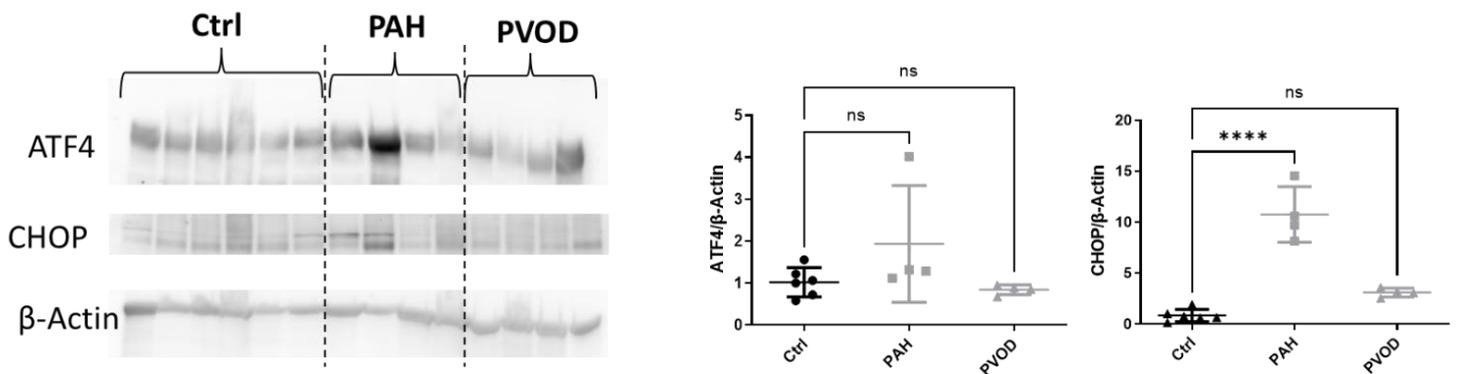


Figure 43 : Niveau protéique des protéines MMP9 et E-selectine dans les groupes expérimentaux

\* $p < 0.05$  ; ns : non statistique ; par un test Mann Whitney

Afin d'avoir une vision plus globale des différentes voies impliquées dans les mécanismes de la MVOPh et de l'HTAPi, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement (Gene Set Enrichment Analysis : GSEA) grâce à la collection Hallmark issue de la base de données MSigDB (Figure 45).

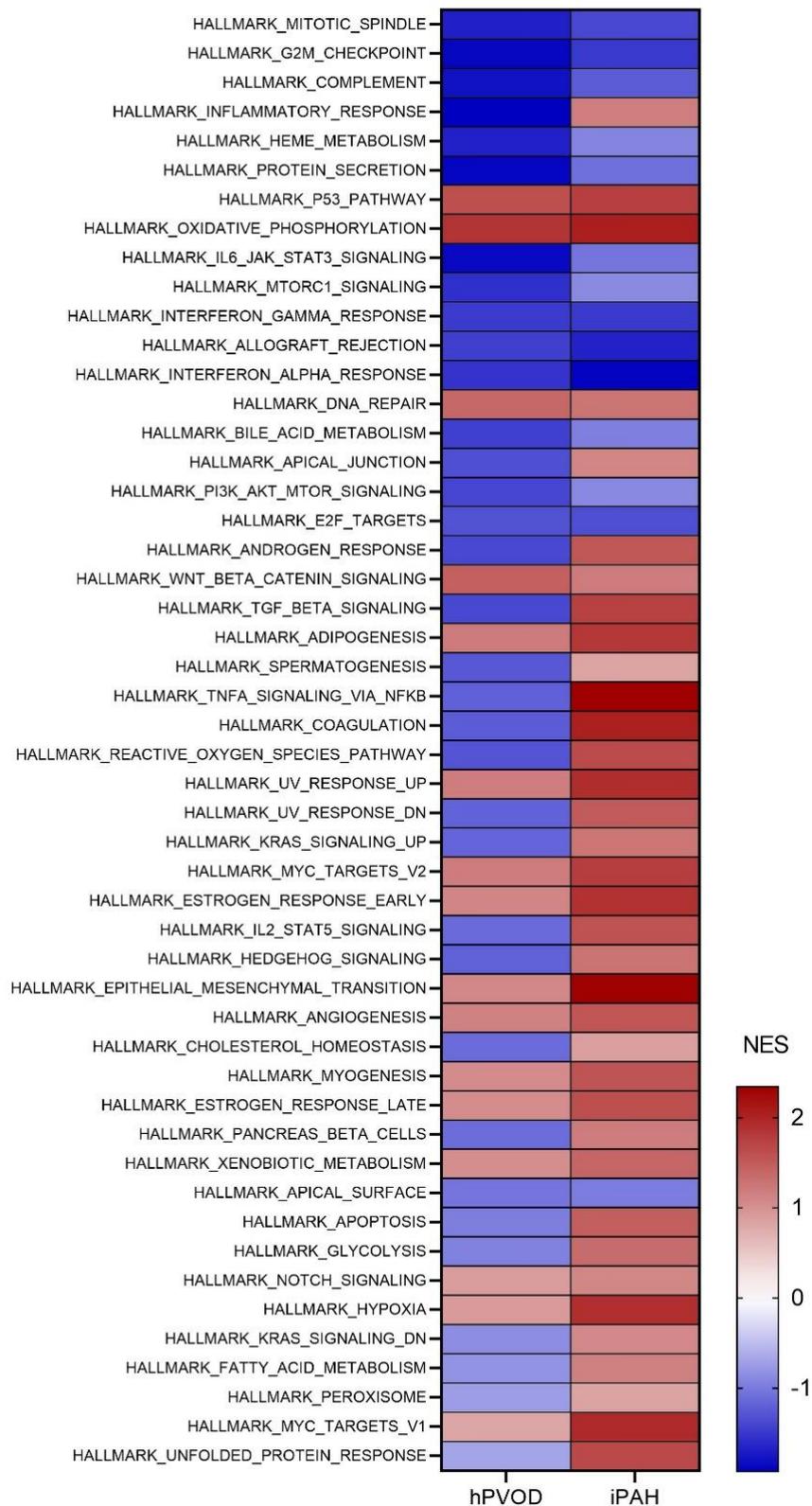
Lorsque l'on compare l'analyse GSEA des MVOPh vs Ctrl avec celle des HTAPi vs Ctrl, vingt voies de signalisations sont régulées à la baisse chez les MVOPh par rapport aux contrôles alors qu'elles sont régulées à la hausse chez les HTAP vs Ctrl. Plusieurs de ces voies sont liées au processus inflammatoire et au processus du métabolisme supposant ainsi l'activation de l'inflammation et une dérégulation métabolique dans les poumons de patients atteints d'HTAPi. Ces activations n'étant pas retrouvées chez les patients MVOPh, cette première analyse met en évidence une différence de signalisation entre les mécanismes de l'HTAPi et de la MVOPh. De plus, l'augmentation protéique de CHOP et d'ATF4 chez les patients HTAPi par rapport aux contrôles et aux MVOPh suggère une activation de la voie de l'ISR (*Integrated Stress Response*) chez les patients HTAPi uniquement (Figure 44).



**Figure 44 : Niveau protéique des protéines ATF4 et CHOP dans les groupes expérimentaux**

\* $p < 0.05$  ; ns : non statistique ; par un test Mann Whitney

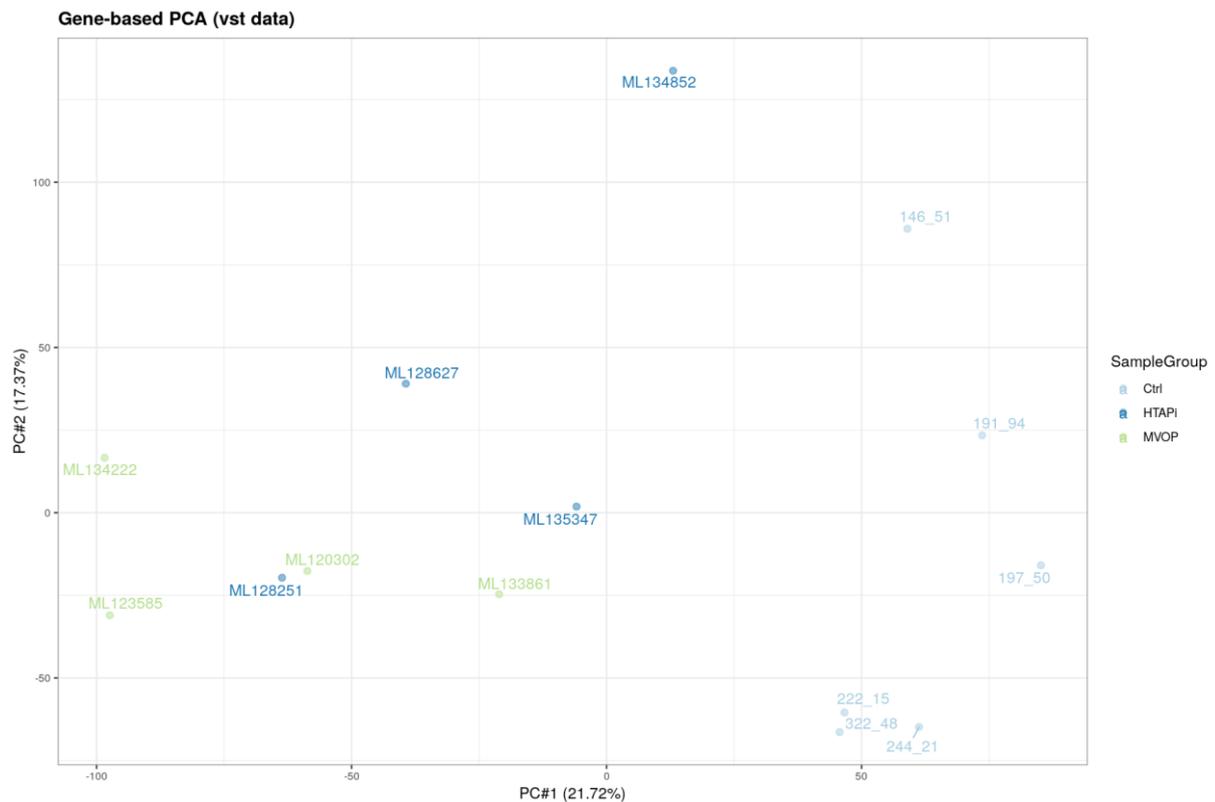
Cependant, la comparaison des analyses GSEA montre aussi des similitudes entre les deux maladies puisque 30 voies de signalisation sont régulées de manière identiques entre la MVOPh et l'HTAPi (figure 45). La voie liée à la phosphorylation oxydative est l'une des voies la plus augmentée chez les patients HTAPi et MVOPh.



**Figure 45 : Comparaison des analyses GSEA entre les MVOP vs Ctrl et HTAP vs Ctrl**

NES : Normalized Enrichment Score. Pour mesurer le degré d'enrichissement des voies de signalisation dans un ensemble de gènes, GSEA utilise le NES. Plus le NES est élevé plus la voie est activée, plus le NES est bas, plus la voie est inhibée.

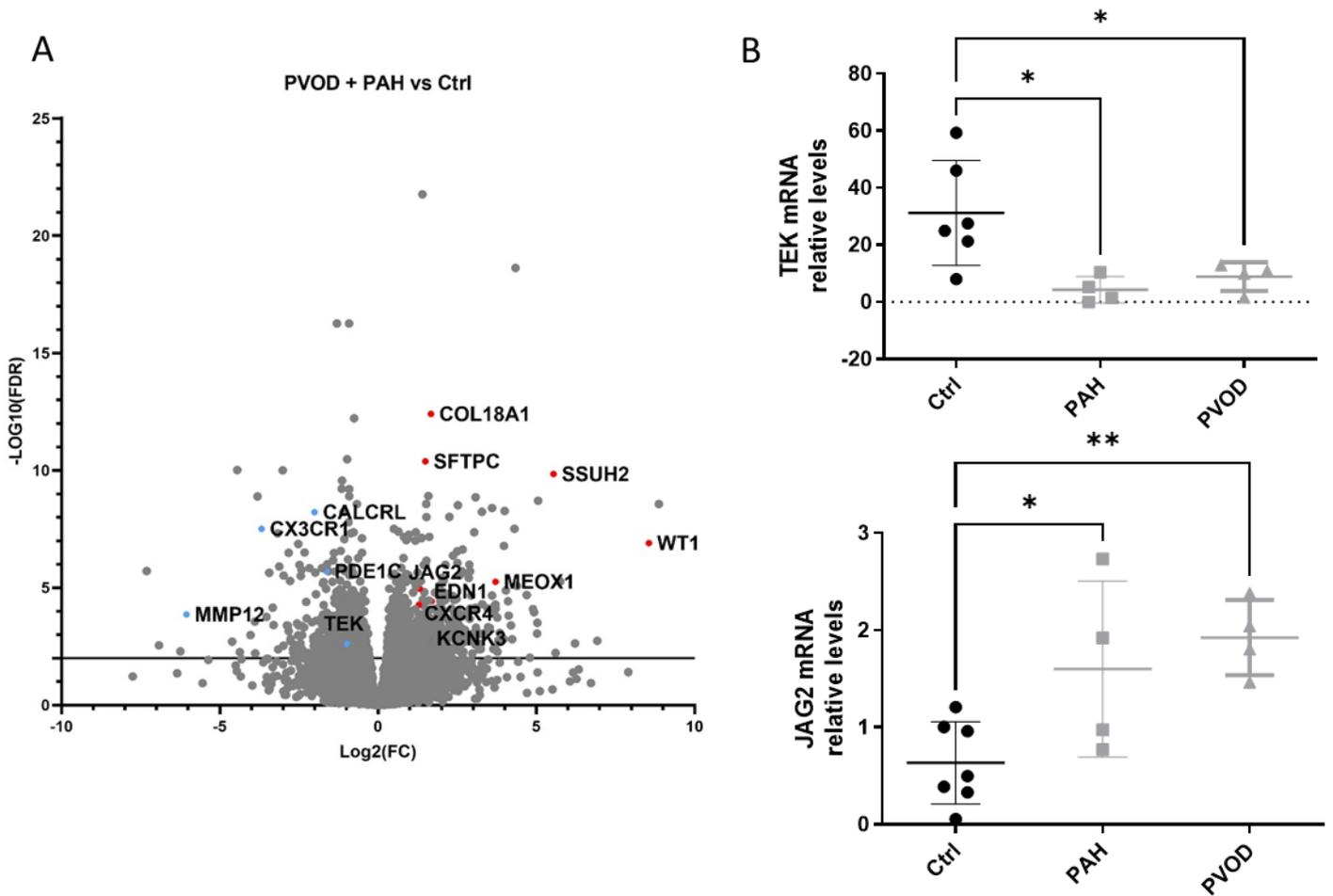
2- À la vue de ces gènes régulés uniquement dans la MVOPh ou dans l'HTAPi, nous avons réalisé une deuxième analyse différentielle en comparant cette fois-ci les échantillons MVOPh aux échantillons HTAPi. Cette analyse a pour but d'identifier les gènes différenciant l'HTAPi de la MVOPh. Cependant, très peu de gènes sont différentiellement exprimés entre les deux maladies avec un total de seulement 16 gènes régulés à la hausse et 57 régulés à la baisse chez les patients MVOPh par rapport au HTAPi. Cette analyse différentielle entre les patients atteints d'HTAPi et de MVOPh correspond aux résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) (Figure 46).



**Figure 46 : Analyse en composantes principales sur tous les échantillons humains**

L'analyse ACP démontre que la variation entre les données d'expression de l'HTAPi et de la MVOPh est très faible et que la plus grande variation est la comparaison entre les maladies fusionnées HTAPi+MVOPh et les contrôles.

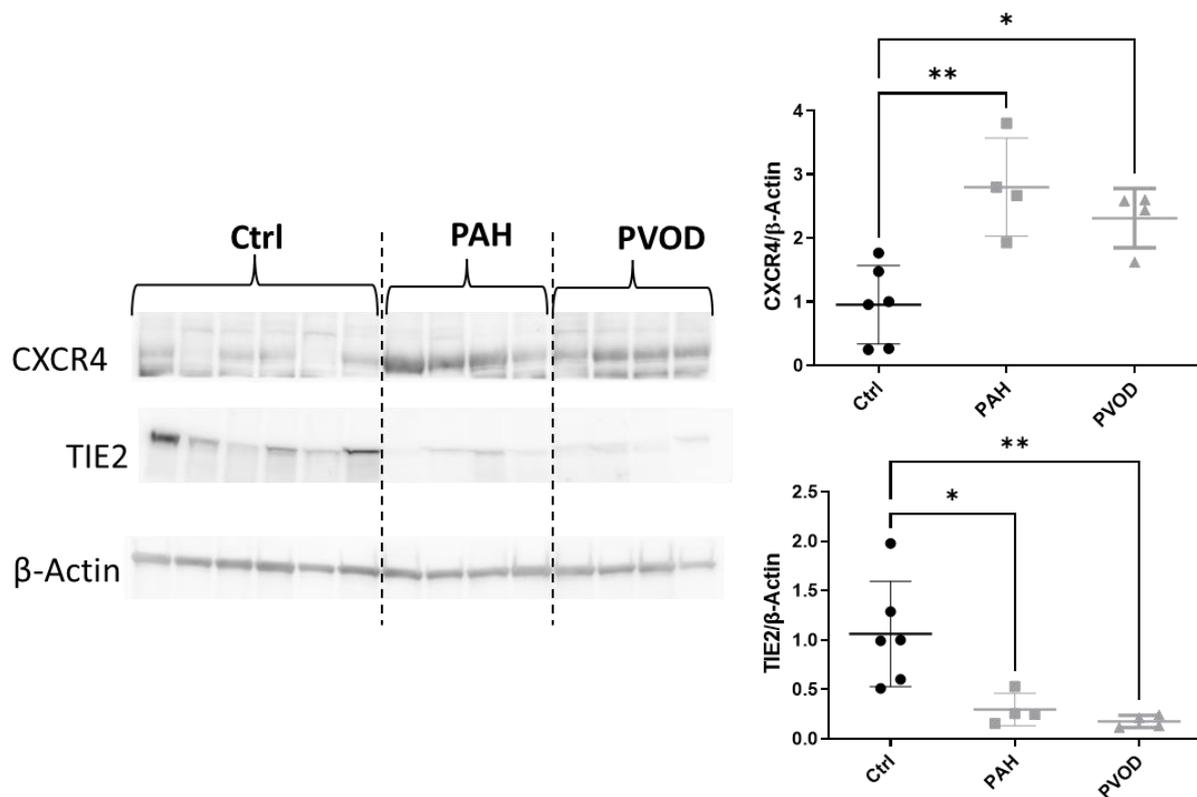
3- Etant donné la faible différence d'expression génique entre l'HTAPi et la MVOPh, nous avons décidé de procéder à une troisième analyse différentielle en fusionnant les données d'expression génique de l'HTAP et de la MVOP et en les comparant aux contrôles sains. Cette analyse nous permet d'accroître la puissance statistique de notre analyse en augmentant le nombre d'échantillon chez les malades. Le groupe MVOP+HTAP représente ainsi un groupe de patients atteints d'hypertension pulmonaire. Nous avons obtenu un total de 590 gènes régulés à la hausse et 428 régulés à la baisse dans le groupe de patients MVOP. Les deux maladies sont caractérisées par une augmentation de l'expression de nombreux gènes tels que KCNK3, JAG2, CXCR4, EDN1, MEOX1, SFTPC et une diminution de l'expression de gènes tels que CALCRL, TEK par rapport aux contrôles. Les gènes TEK et JAG2 ont été vérifiés par RT-qPCR (Figure 47).



**Figure 47 : Résultats de l'analyse différentielle fusionnant les échantillons HTAP et MVOP**

A : Volcano plot des gènes différentiellement exprimés. Chaque point représente un gène. Tous les gènes au-dessus du tracé noir sont significatifs (FDR<0,05). Certains gènes ont attiré notre attention et sont étiquetés. Ceux qui sont en bleus sont régulés à la baisse, ceux qui sont en rouges sont régulés à la hausse. B : Expression des gènes TEK et JAG2 mesurées par RT-qPCR. \*p<0.05 ; \*\*p<0.005 ; par un test Mann Whitney

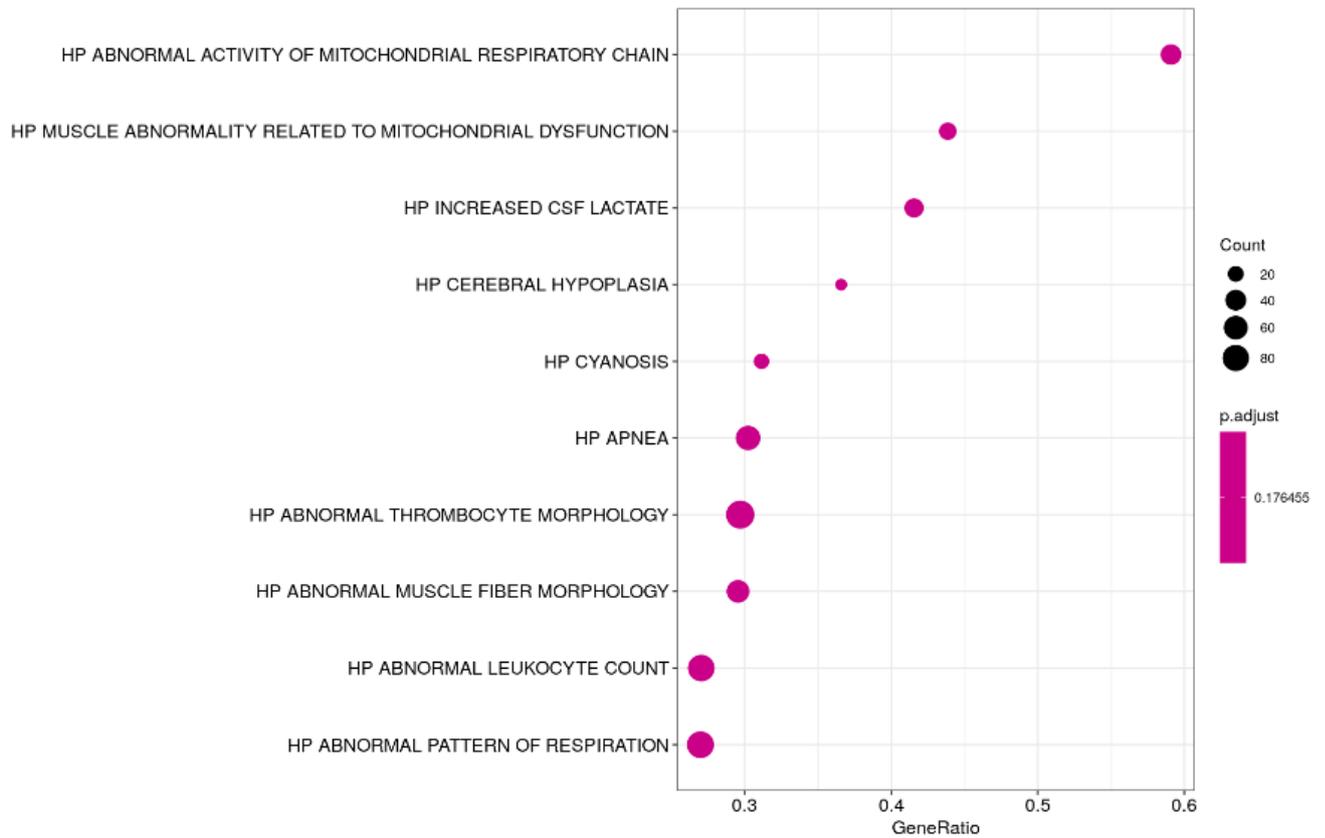
Les protéines Tie2 (codée par TEK) et CXCR4 ont été vérifiées à l'échelle protéique par western blot (Figure 48).



**Figure 48 : Niveau protéique des protéines CXCR4 et TIE2 dans les groupes expérimentaux**

\*p<0.05 ; ns : non statistique ; par un test Mann Whitney

Pour explorer davantage les voies communes aux mécanismes de l'HTAPi et de la MVOPh, nous avons réalisé une analyse GSEA en fusionnant les données de l'HTAPi et de la MVOPh et les avons comparées aux données des contrôles. Nous avons utilisé la sous-collection « HPO : Human Phenotype Ontology » présentant une terminologie des anomalies phénotypiques rencontrées dans les maladies humaines. L'analyse GSEA avec la collection HPO a montré une activité anormale de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les poumons des patients atteints d'HTAP ou de MVOP (Figure 49), ce qui rejoint l'analyse précédente de GSEA avec la collection Hallmark montrant que la phosphorylation oxydative est l'une des voies les plus régulées dans les deux maladies. Le dysfonctionnement mitochondrial semble donc participer aux mécanismes physiopathologiques des deux maladies.



**Figure 49 : Dotplot indiquant le ratio entre le nombre de gènes surreprésentés dans notre liste de gènes et les gènes de la voie de signalisation.**

Plus le ratio est élevé plus la voie de signalisation est sur-représentée dans l'ensemble des gènes différemment exprimés.

Ces trois types d'analyse permettent d'explorer en profondeur les similitudes et les différences entre les patients HTAPi et les patients MVOPh.

# Discussion

---



Le but initial de mon projet de thèse était de créer un modèle animal de MVOP héréditaire. Etant donné que les rats déficients en Gcn2 ne développent pas spontanément la maladie, nous avons cherché à déclencher la MVOP chez ces rats par divers stress à court ou long terme, tels que des stress inflammatoires ou métaboliques. Comme aucun de ces stress n'a permis d'induire la maladie, nous avons décidé de réorienter le projet et de le diviser en deux études :

1- Une étude focalisée sur les conséquences moléculaires et cellulaires au niveau pulmonaire de la perte de fonction de Gcn2 chez le rat KO en réponse à un stress métabolique aigu.

2- Une étude du profil transcriptomique de poumons humains atteints d'HTAP idiopathique et de MVOP héréditaires comparés à des poumons contrôles.

La discussion se divisera donc en trois parties : nous commencerons par argumenter nos données trouvées chez le rat puis nous continuerons avec les données humaines. Enfin, même si les deux études portent sur deux espèces différentes, nous confronterons l'ensemble des résultats obtenus chez le rat et l'humain.

## Discussion sur les résultats observés chez le rat $Gcn2^{-/-}$

Les rats  $Gcn2^{-/-}$  ont été exposés à un stress métabolique à court terme par l'injection d'une dose d'asparaginase, un médicament anti-leucémique qui prive la cellule en asparagine et en glutamine. C'est la seule condition qui permet de différencier les rats WT et  $Gcn2^{-/-}$  puisque les rats  $Gcn2$  mutants subissent une perte de poids rapide et des conséquences fatales quelques jours après l'administration alors que les rats WT ne présentent aucune détérioration physiologique significative. Nous avons réalisé une analyse du transcriptome par RNAseq et par single-cell RNAseq dans les poumons de rats  $Gcn2^{-/-}$  et WT trois jours après une injection unique d'ASNase afin d'explorer la réponse moléculaire et cellulaire à ce stress dans les poumons de rats WT et  $Gcn2$  mutant.

En condition basale, l'analyse du RNAseq isole seulement cinq gènes différentiellement régulés entre les rats  $Gcn2^{-/-}$  et WT, ce qui est cohérent avec l'absence d'altérations du phénotype chez les rats déficients en  $Gcn2$ . Cependant, via le scRNAseq, nous observons une forte augmentation des cellules T\_LAG3 dans les poumons des rats  $Gcn2$  KO.

Cette population cellulaire, unique aux rats  $Gcn2^{-/-}$ , se différencie des autres populations par l'expression du marqueur LAG3, un homologue de CD4 qui transmet un signal inhibiteur aux lymphocytes T. Une exposition persistante aux antigènes entraîne une expression accrue de LAG3 et contribue à un état "d'épuisement" responsable d'une altération de la prolifération des lymphocyte T ainsi qu'une diminution de la production de cytokines<sup>340</sup>. La cytométrie de flux nous a montré que la localisation de LAG3 dans cette population de cellules T observée chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  en condition basale est uniquement intracellulaire. Des études précédentes ont démontré que la protéine LAG3 est principalement localisée dans le compartiment intracellulaire et qu'elle est transloquée vers la surface cellulaire lors d'une stimulation antigénique<sup>341</sup>. En condition non stimulée, ce qui est le cas pour le groupe  $Gcn2^{-/-}$  Vhcl, la majorité de LAG3 est dégradée dans les compartiments lysosomaux<sup>341</sup>.

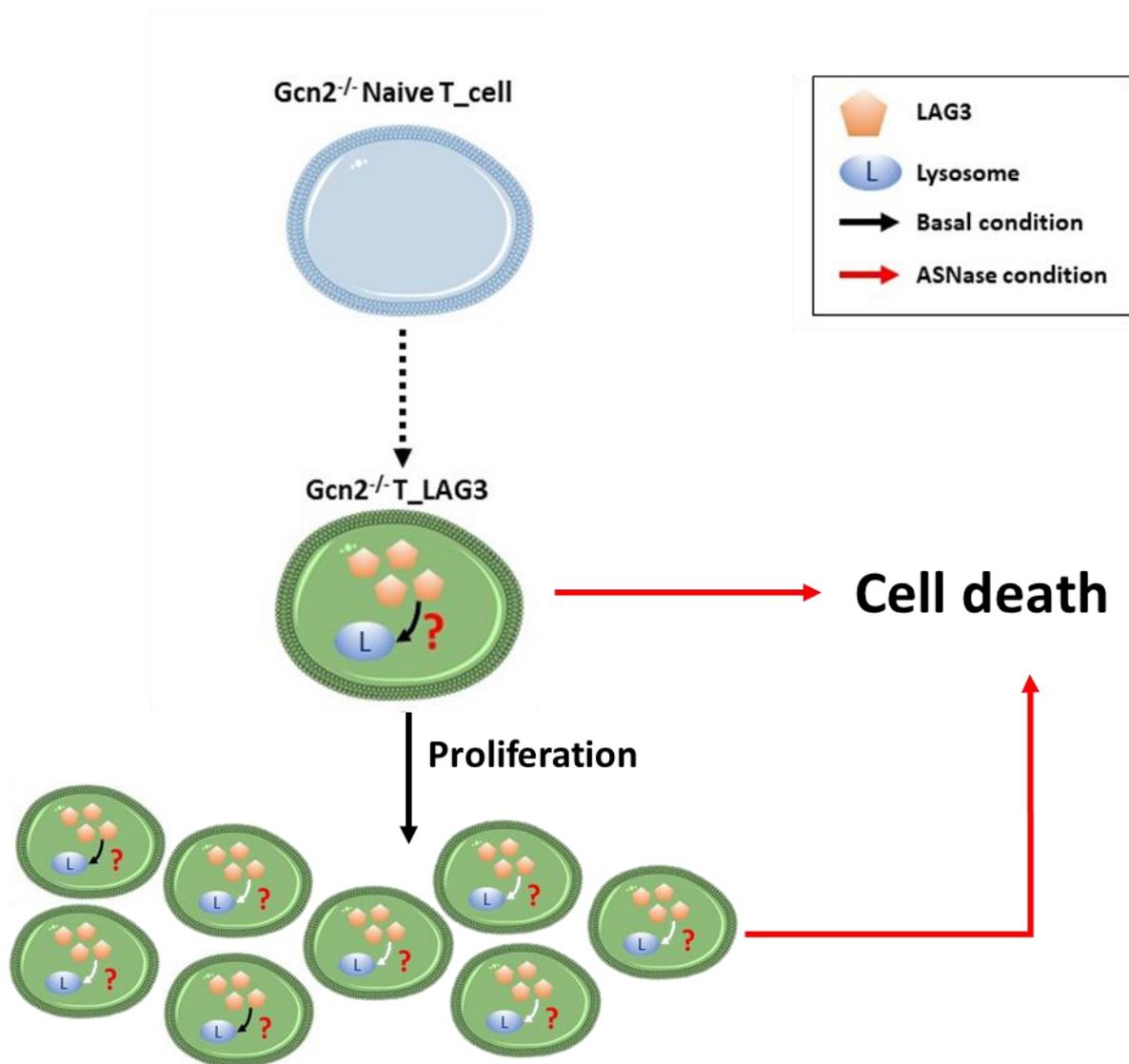
L'analyse d'expression différentielle centrée sur les cellules T\_LAG3 nous a montré une augmentation de l'expression de LAG3 chez les  $Gcn2^{-/-}$  par rapport aux WT en condition basale. S'il y a une accumulation de LAG3 intracellulaire chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  en condition non stimulée, cela pourrait être due à une altération de la dégradation des protéines dans le lysosome. En combinaison avec les résultats de l'analyse de trajectoire démontrant que les

cellules T\_LAG3 et les cellules T naïves sont dans le même état de différenciation, nous spéculons que la perte de GCN2 induit le dysfonctionnement du développement des cellules T naïves résultant en une population unique de cellules T\_LAG3 avec un lysosome défectueux. Il est important de noter que ces processus observés sont à l'état basale. Il semblerait donc que GCN2 possède plus qu'un rôle de simple détecteur de manque en acides aminés.

Notons que la population de cellules T\_Prolif est également très augmentée chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  en condition non stimulée. La population des cellules T\_prolif des rats  $Gcn2^{-/-}$  exprime fortement LAG3 par rapport aux rats WT. Nous supposons donc que la population T\_LAG3 prolifèrent chez les  $Gcn2^{-/-}$  en condition basale.

La population T\_LAG3 disparaît sous traitement à l'ASNase. Tout d'abord, nous savons que l'absorption de la glutamine et de l'asparagine est essentielle pour la survie et la différenciation des lymphocytes  $T^{369,370}$ . De plus, dans un contexte de carence en acides aminés par l'ASNase, il a été précédemment montré que les cellules T ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD4^+/CD8^+$ ), les cellules B ( $B220^+$   $sIgM^+$ ) et les leucocytes ( $CD11b^+$ ) des souris  $Gcn2^{-/-}$  subissent un taux de mort cellulaire élevé<sup>342</sup>. Nous supposons donc que la population T\_LAG3 déficients en GCN2 subit une mort cellulaire sous ASNase.

La fonction de GCN2 dans la prolifération des lymphocytes T dans un contexte de manque en acides aminés, est controversée. Nos données montrent une diminution de la prolifération des lymphocytes T chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  traités par l'ASNase, un résultat cohérent avec le travail de Van de Velde et coll qui montre que les lymphocytes T, qu'elles soient déficientes ou non en GCN2, ne prolifèrent pas en présence de faibles concentrations de différents acides aminés (asparagine, leucine, tryptophane et arginine)<sup>151</sup>. Nous supposons que la diminution de la population T\_Prolif est due à la mort des lymphocytes T\_LAG3 en prolifération (Figure 50).



**Figure 50 : Evolution de la population T<sub>LAG3</sub> chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> dans les différentes conditions expérimentales**

En condition basale (flèches noirs), une population de T<sub>LAG3</sub> apparaît chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup>. Cette population est caractérisée par une accumulation intracellulaire de la protéine LAG3. L'hypothèse (?) est qu'il existe une dysfonction lysosomal dans ces lymphocytes T. Ces cellules sont dans le même état de différenciation que les Naïve T<sub>cells</sub>. De plus cette population prolifère. Sous traitement ASNase (flèches rouges), la population T<sub>LAG3</sub> meurt. La population T<sub>prolif</sub> diminue drastiquement supposant que les cellules exprimant LAG3 et qui sont en prolifération meurent aussi.

Étant donné que GCN2 joue un rôle dans la différenciation<sup>345,371</sup>, il est possible que les cellules T déficientes en GCN2 ne puissent pas se différencier aussi efficacement que les cellules WT en cas de privation d'asparagine et de glutamine. En effet, nous avons constaté que la population des lymphocytes T effectrices (T<sub>Eff</sub>), correspondant aux cellules T activées, est significativement réduite chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> par rapport aux rats WT sous traitement à l'ASNase, tandis que les T<sub>naïfs</sub>, correspondant aux cellules T quiescentes, sont inchangés par rapport aux groupes expérimentaux. De plus, au lieu d'être essentielle à la prolifération des

cellules T, comme l'ont proposé Munn et coll<sup>150</sup>, Van de Velde et coll suggèrent que GCN2 est nécessaire à la fonction cytotoxique des lymphocytes T effectrices (T\_Eff).

Dans l'ensemble, la perte de GCN2 induit un dysfonctionnement du développement des cellules T conduisant à une population T\_LAG3 proliférantes incapable de survivre lorsque les rats sont soumis à un stress métabolique. Le traitement à l'ASNase affecte la différenciation des cellules T déficientes en GCN2, entraînant une diminution de la population T\_Eff combinée à un, potentielle, dysfonctionnement de la cytotoxicité.

Il a déjà été démontré que GCN2 est d'une importance critique pour le foie et le pancréas afin de limiter la toxicité de l'asparaginase<sup>32,347</sup>. Conformément à ces résultats, des vacuoles cytosoliques sont présentes dans le foie des rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> traité à l'ASNase, suggérant une stéatose et une inflammation. Nous ne pouvons pas exclure que des médiateurs inflammatoires provenant d'autres organes, comme le foie ou l'intestin, ciblent les poumons et induisent indirectement des lésions pulmonaires.

Comme décrit précédemment chez la souris, nous confirmons que la protéine kinase GCN2 est nécessaire pour activer l'ISR (integrated stress response) chez les rats traités par l'ASNase.

Conformément aux études précédentes portant sur le foie montrant que la défaillance de l'ISR peut conduire à une augmentation de l'apoptose<sup>342</sup>, nous montrons par immunofluorescence TUNEL que l'apoptose est accrue dans les cellules pulmonaires de rats déficients en *Gcn2* après traitement par l'ASNase. De plus en plus d'études montrent que la mort cellulaire peut activer la réponse immunitaire, que ce soit par le transfert d'antigènes au système immunitaire ou par la libération de DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern)<sup>372,373</sup>. Nous supposons, ainsi, que l'augmentation de la mort cellulaire est l'un des déclencheurs de l'inflammation chez le rat déficient en *Gcn2* sous traitement par l'ASNase.

Ravishankar et coll ont démontré le rôle important de GCN2 dans la régulation de la tolérance immunitaire déclenchée par les antigènes des cellules apoptotiques. Ces antigènes apoptotiques sont capables d'induire la production de l'IL-10 et TGF- $\beta$  dans les macrophages via l'activation de GCN2<sup>157</sup>. En accord avec nos résultats, nous pouvons donc suggérer que les macrophages déficients en GCN2 des rats soumis à un traitement par l'ASNase n'ont pas réussi à induire la production d'IL-10 et de TGF- $\beta$ .

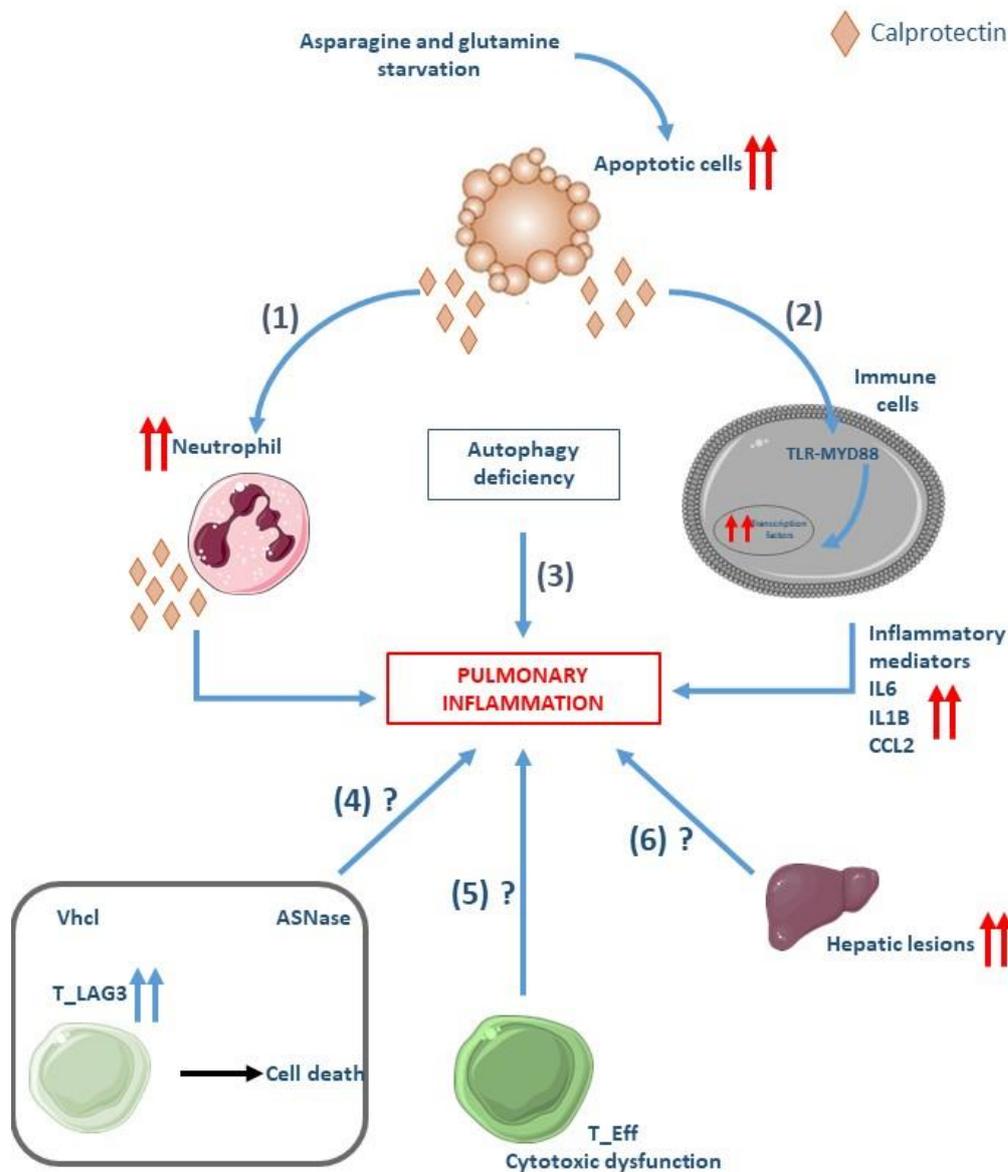
Ensuite, nous avons constaté qu'une molécule DAMP appelée calprotectine, dont les deux sous-unités sont codées par les gènes *S100A8* et *S100A9*, est fortement surexprimée dans les poumons et dans le sérum des rats mutants *Gcn2* traités. Plusieurs rapports ont suggéré que le système immunitaire détecte la mort cellulaire par la voie TLR2 et/ou TLR9<sup>374</sup>. De plus, les molécules DAMP, comme la calprotectine, sont capables d'activer la voie TLR soit dans les cellules sentinelles (macrophages et mastocytes), soit de manière autocrine dans les neutrophiles<sup>375,376</sup>. Ces données, ainsi que nos résultats montrant une surexpression de TLR2, MYD88, IL6 et IL1B, établissent collectivement que l'augmentation de la mort cellulaire peut être responsable de l'augmentation du processus d'inflammation en libérant la calprotectine et en induisant l'activation de la voie TLR.

La calprotectine est aussi impliquée dans la migration des neutrophiles vers les sites inflammatoires<sup>377</sup>. Son expression accrue chez les rats mutants *Gcn2* explique, au moins en partie, l'augmentation de la population de cellules neutrophiles attestée par le scRNAseq et l'analyse par immunofluorescence des cellules pulmonaires.

Nos résultats suggèrent également une activation des cellules endothéliales par le biais de l'IL-6 et de la sélectine E, dont l'expression a été augmentée par RNASeq. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation des neutrophiles chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> sous ASNase car l'expression accrue de la sélectine E dans les cellules endothéliales favorise le recrutement des neutrophiles<sup>378,379</sup>. L'analyse par immunofluorescence des sections de poumons indique que la population de neutrophiles est localisée dans les zones périvasculaires. L'augmentation des neutrophiles périvasculaires, associée à l'augmentation de MMP9, connue pour favoriser la revascularisation d'un site inflammé<sup>380</sup>, suggère un rôle possible des neutrophiles dans le remodelage vasculaire. Il a été démontré précédemment que les neutrophiles facilitent le recrutement des monocytes, ce qui explique probablement l'augmentation des monocytes chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> traités par l'ASNase<sup>381</sup>.

Enfin, l'activation de l'inflammation peut également être la conséquence d'une autophagie défectueuse chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup>. Ravindran et coll ont démontré une réponse inflammatoire accrue dans l'intestin des souris *Gcn2*<sup>-/-</sup> lors de l'administration orale de sulfate de dextran sodique (DSS). Cette augmentation de l'inflammation est dû à l'absence d'activation de l'autophagie<sup>159</sup>. Conformément à leurs résultats, nous avons constaté que l'autophagie n'était

pas induite chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> traités par l'ASNase, contrairement aux rats WT. Ces résultats ont été obtenus au niveau protéique sur des éléments clés de ces deux voies.



**Figure 51 : Schéma récapitulatif des différentes voies impliquées dans l'augmentation de l'inflammation pulmonaire chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> traité à l'asparaginase**

Sous ASNase, le manque de glutamine et d'asparagine induit une augmentation du processus d'apoptose chez le rat *Gcn2*<sup>-/-</sup>. Les cellules apoptotiques libèrent de la calprotectine.

(1) Recrutement des neutrophiles par effet chemo-attracteur dans les poumons

(2) Activation de la voie TLR-MYD88 dans les cellules immunitaires. L'augmentation d'expression des médiateurs comme les interleukines et les chimiokines favorisent l'inflammation pulmonaire

(3) Une diminution de l'autophagie chez les *Gcn2*<sup>-/-</sup> participe à l'augmentation du processus inflammatoire

(4) Hypothèse : La population T\_LAG3 est-elle nécessaire aux rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> pour contrer l'inflammation ?

(5) Hypothèse : Y a-t-il une dysfonction de la fonction cytotoxique des T\_Eff les empêchant ainsi d'éliminer les éléments pathogènes de l'organisme ?

(6) Hypothèse : L'inflammation pulmonaire est-elle secondaire à une inflammation hépatique ?

L'activation du système immunitaire innée dans le poumon en réponse au stress métabolique chez les rats déficients en Gcn2 est centrée autour de la libération de la calprotectine. Celle-ci est capable d'activer la voie TLR et d'activer le recrutement des neutrophiles (Figure 51). Nous proposons une qualité nouvelle de GCN2, qui en plus de sa fonction de capteur d'acides aminés, intervient dans l'adaptation du système immunitaire adaptatif dans des conditions basales.

Notre étude comporte certaines limites qui doivent être discutées. La première est l'absence de développement de la MVOP chez les rats déficients en Gcn2, ce qui empêche l'observation d'événements moléculaires et cellulaires qui ne sont pas présents puisque le remodelage vasculaire n'a pas eu lieu. Les expériences scRNAseq ont pu être biaisées si toutes les populations de cellules pulmonaires n'ont pas été correctement extraites et incluses dans l'analyse. Cependant, nous avons mené l'étude conformément aux protocoles standard pour les expériences pulmonaires. Enfin, compte tenu de la gravité des conséquences physiologiques du traitement à l'ASNase chez les rats déficients en Gcn2, certaines modulations génétiques sont intégrées dans des réseaux de gènes qui sont impliqués dans la réponse à ce stress, mais d'autres régulations génétiques peuvent être secondaires à la catastrophe métabolique et à la défaillance des tissus extra-pulmonaires qui se produisent chez ces rats, et peuvent être difficiles à interpréter. Par conséquent, soit il existe une régulation intégrée que nous ne comprenons pas, soit il y a plusieurs augmentations stochastiques de gènes dues à un état physiologique systémique compromis.

## Discussion sur les résultats observés chez l'humain

L'objectif initial de ce projet est d'observer les différences mais aussi les similitudes d'expression génique entre l'HTAP idiopathique et la MVOP héréditaire. Une analyse du transcriptome des patients HTAP a pu mettre en évidence l'activation des processus liés à l'inflammation et au métabolisme dans les poumons de ces patients. Ces deux processus sont, en revanche, régulés à la baisse dans les poumons des patients atteints de MVOP. A l'inverse, certaines modifications ont été observées de manière uniforme dans les différents échantillons d'HTAP et de PVOD. Ces similitudes nous amènent à penser que ces modifications sont intrinsèques au développement des deux maladies, pas nécessairement causales mais appartenant aux processus pathologiques de l'hypertension précapillaire.

Étant donné que la MVOP et l'HTAP présentent des caractéristiques hémodynamiques et histologiques similaires, il n'est pas surprenant de trouver des modifications génétiques communes aux deux maladies. Nous avons donc trouvé des régulations de gènes cohérentes avec les lésions vasculaires observées dans les poumons des patients HTAP et MVOP. L'augmentation d'expression du gène SFTPC, codant pour la protéine SP-C, est connue pour participer au développement de la fibrose dans la maladie de la fibrose pulmonaire spontanée chez la souris<sup>382</sup>. Le gène MEOX1 code pour une homéobox du mésenchyme impliquée dans la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires et le remodelage vasculaire<sup>383</sup>. Nos données suggèrent que le ciblage de MEOX1 pourrait être une nouvelle approche pour traiter les maladies vasculaires prolifératives.

A l'inverse, les régulations de certains gènes ne sont pas en accord avec les résultats décrits dans la littérature. C'est le cas pour le gène KCNK3, un gène dont la déficience partielle (à l'état hétérozygote) entraîne une prédisposition à l'HTAP<sup>263</sup>. L'inhibition de KCNK3 induit, chez le rat, une néomuscularisation distale et une hémodynamique caractéristiques de l'hypertension pulmonaire<sup>384</sup>. Par conséquent, l'expression accrue de KCNK3 pourrait refléter un mécanisme de contre-régulation chez l'humain.

Ce qui est d'autant plus intéressant est que certains gènes n'ont, pour la majorité, pas été étudiés dans la MVOP laissant ainsi le champ libre à de nouvelles perspectives de recherche afin de mieux cerner les mécanismes physiopathologiques de cette maladie.

Plusieurs études ont rapporté que l'expression de COL18A1, codant pour l'endostatine, est nettement augmentée dans les vaisseaux pulmonaires remodelés présents dans l'HTAP<sup>385</sup>. De plus, des concentrations élevées d'endostatine circulante sont observées dans l'HTAP et sont corrélées à une hémodynamique pulmonaire défavorable<sup>386</sup>. L'augmentation d'expression du gène COL18A1 dans les poumons des patients HTAP fournit une base moléculaire à ces résultats plasmatiques cliniques. De plus, cette augmentation est retrouvée chez les patients MVOP. Ces données supposent que l'endostatine pourrait aussi être utilisée comme biomarqueur d'évolution de la MVOP.

L'expression des gènes codant pour CXCR4 et son ligand CXCL12 (SDF1) est augmentée à la fois dans la MVOP et l'HTAP. Les niveaux de protéines de CXCL12 et CXCR4 ont été trouvés augmentés dans les poumons humains de patients atteints d'HTAP<sup>387</sup>. Cette chimiokine et son récepteur sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et la réponse à l'inflammation. Bordenave et coll ont précédemment montré que l'inhibition de CXCL12 par des composés neutralisants et le blocage pharmacologique de CXCR4 étaient capables d'inverser partiellement l'hypertension pulmonaire (HP) établi dans chez le rat atteint d'HP, de diminuer les résistances vasculaires pulmonaires et le remodelage des artérioles pulmonaires<sup>387</sup>. Il est intéressant de noter que l'expression de ces deux gènes sont également augmentée dans la MVOP, ce qui suggère une implication de cette voie dans le développement de la MVOP similaire à celle retrouvée dans l'HTAP.

Le gène TEK, codant pour la protéine TIE2, un récepteur tyrosine kinase de l'angiopoïétine I (ANG1), dont les expressions protéiques et géniques sont diminuées dans les groupes de patients MVOPh et HTAPi examinés, joue un rôle dans l'angiogenèse et le contrôle des jonctions endothéliales<sup>388</sup>. L'expression d'ANGPT1, codant pour l'angiopoïétine-1, est également diminuée mais de façon non significative. L'équipe de Kugathasan ont étudié des modèles de souris transgéniques pour les gènes *TEK* et *ANGPT1*. Ils ont démontré que l'haplo insuffisance du gène TEK suffit à déclencher une augmentation des résistances vasculaires chez la souris. Il conclut en affirmant que, sous stress inflammatoire, la voie angiopoïétine-1-TIE2 protège ces souris du développement de l'HTAP en favorisant la survie des cellules endothéliales<sup>389</sup>. Ainsi, il est possible que la diminution de l'expression de TEK participe au dysfonctionnement des cellules endothéliales retrouvé chez les patients HTAP mais aussi chez les patients MVOP. Communément inscrit dans la pathogénèse de l'HTAP, peu d'études ont

analysé la dysfonction endothéliale dans la MVOP. Cette première observation met en exergue une dysfonction endothéliale chez les patients MVOP similaire aux patients HTAP. La découverte d'une augmentation de l'expression de l'EDN1, dans les poumons HTAP et MVOP renforce cette hypothèse. Des travaux antérieurs démontrent que l'ET-1, protéine codée par *EDN1*, est un acteur majeur du déséquilibre vasodilatateur/vasoconstricteur caractéristique de l'HTAP<sup>390,391</sup>. Etant donné que la protéine ET-1 est susceptible de participer à la composante vasoactive de l'HTAP, l'augmentation de l'expression d'EDN1 dans les poumons de MVOP suggère un rôle similaire de l'ET-1 dans la pathogenèse de la MVOP.

En présumant qu'un dysfonctionnement endothélial soit présent dans la MVOP héréditaire, on peut supposer que la déficience en *Gcn2* endosse un rôle important. Le travail de Manaud et coll le confirme puisqu'ils ont montré que la perte de *GCN2* diminuait la phosphorylation des SMAD 1/5/9 dans les tissus pulmonaires de rat *GCN2* KO. Etant donné que l'activation des SMAD1/5/9 est également diminuée dans les patients atteints de MVOP héréditaire, Manaud et coll suggèrent que la perte de fonction de *GCN2* participe au déséquilibre entre la voie TGF- $\beta$ /BMP reconnue comme, en partie, responsable de la dysfonction endothéliale<sup>335</sup>.

Enfin, les analyses d'enrichissement avec les collections Hallmark et HPO, réalisées sur les DEGs des différents groupes expérimentaux ont respectivement mis en évidence une surreprésentation de la voie « oxidative phosphorylation » et « abnormal activity of mitochondrial respiratory chain » chez les patients atteints d'HP (groupe HTAP+MVOP) par rapport aux contrôles. Des précédentes études démontrent la présence d'une dysfonction mitochondriale, caractérisée par une augmentation de la glycolyse et une diminution de l'oxydation de glucose dans les cellules pulmonaires vasculaires, chez les patients HP<sup>392,393</sup>. Ainsi, l'augmentation des processus de phosphorylation oxydative ne semble pas cohérente avec la littérature. De plus, les gènes codant pour les facteurs de transcription HIF-1 et HIF-2 $\alpha$  et le gène codant pour la kinase PDK1, tous connus pour être essentiels dans ce changement métabolique, ne sont pas régulés chez les patients HP. En s'intéressant de plus près aux gènes appartenant à la voie « oxidative phosphorylation », nous nous sommes rendus compte que ces gènes étaient très faiblement régulés. Ce résultat met en évidence la limite des analyses d'enrichissement. En effet, GSEA permet de détecter les situations où tous les gènes d'un ensemble prédéfini changent de manière coordonnée. L'analyse GSEA classe les gènes selon leurs FDR et Log2FC donnant naissance à une liste de gènes classés (L). Plus un gène est régulé

à la hausse, plus son rang sera élevé et à l'inverse plus un gène est régulé à la baisse, plus son rang sera bas. Les bases de données regroupent des ensembles de gènes (S) définis comme représentatifs d'une voie de signalisation. Le but de GSEA est de déterminer si les membres de (S) sont distribués de manière aléatoire dans la liste de gènes classés (L) ou s'ils se trouvent principalement en haut ou en bas de la liste. Les voies de signalisation en haut de la liste sont activées et possèdent des scores d'enrichissements élevés et les voies de signalisation en bas de la liste sont inhibées avec des scores d'enrichissements bas. Un certain nombre de gènes appartenant à la voie « oxidative phosphorylation » sont régulés de manière similaire (Log2FC très proche) ce qui a induit une augmentation statistique de leur score d'enrichissement même si individuellement, les gènes de cette voie ne sont que peu différenciellement régulés.

Etudier les similitudes entre l'HTAP et la MVOP nous a permis de confirmer la régulation de certains gènes et processus déjà préalablement étudiés dans la l'HTAP mais encore jamais mis en évidence dans le développement de la MVOP.

Les MMPs, appartenant aux enzymes protéolytiques capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire (MEC), sont classées en 6 groupes en fonction de la spécificité de leurs substrats :

- Collagénases interstitielles (MMP1, MMP8, MMP13 et MMP18)
- Collagénases ou gélatinases de type IV (MMP2 et MMP9)
- Stromelysines (MMP3, MMP10, MMP11 et MMP19)
- Matrilysines (MMP7 et MMP26)
- MMP transmembranaires (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 et MMP25)
- Autres MMP (MMP12, MMP20, MMP21, MMP22, MMP23, MMP27 et MMP28)

En ce qui concerne les différences moléculaires entre la MVOP et l'HTAP, nous avons confirmé la diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP9 (métalloprotéinases matricielles 9) dans les explants pulmonaires humains de la PVOD, observation déjà mentionnée par Neubert et coll<sup>394</sup>.

Il a été montré qu'une dégradation accrue de la matrice extracellulaire (MEC) entraîne l'activation de facteurs de croissance. Ces facteurs augmentent le dépôt de collagène et d'autres protéines de la MEC en stimulant leur sécrétion par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. L'expansion de la MEC dans les trois couches de la paroi vasculaire pulmonaire

entraîne une fibrose vasculaire<sup>395</sup>. Neubert et coll ont suggéré un rôle potentiel de MMP9 dans le remodelage des veines et des veinules pulmonaires. Cependant, c'est l'augmentation, et non la baisse, d'expression de MMP9 qui semble être impliquée dans la dégradation, ainsi que dans la réorganisation de la MEC<sup>396</sup>. Si l'on considère le changement d'expression comme un mécanisme physiopathologique putatif, l'extinction de l'expression de MMP9 est donc contre-intuitive dans les poumons des patients atteints de MVOP au vu de la fibrose intimale présente dans les veines pulmonaires. Ainsi, nous pouvons supposer que la diminution de MMP9 serait un processus protecteur non suffisant pour protéger les patients du développement de la MVOP.

A l'inverse, les artères pulmonaires d'animaux atteints d'HTAP induite par la monocrotaline et l'hypoxie, présentent une expression accrue des MMP et autres enzymes protéolytiques<sup>397</sup>. De même, les sérums des patients atteints d'HTAP présentent une augmentation de la concentration de MMP9 et MMP2<sup>398</sup>. Enfin, le remodelage de la MEC dans l'HTAP a été associé à l'EndoMT car les cellules endothéliales, se différenciant en cellules mésenchymateuses de type myofibroblastique, possèdent une expression accrue de la MMP2 et de la MMP9<sup>399,400</sup>. Ces résultats cumulés suggèrent donc une augmentation d'expression des MMPs et en particulier de MMP9 dans l'HTAP ce que nous n'avons pas confirmé avec nos analyses protéiques même si une tendance à l'augmentation a bien été relevée chez les patients HTAP par rapport aux contrôles.

La différence majeure concerne l'activation de l'inflammation chez les patients HTAP qu'on ne retrouve pas chez les patients MVOP. L'inflammation semble être une caractéristique pathologique importante de l'HTAP, comme le suggère l'infiltration de cellules inflammatoires, notamment de macrophages, de lymphocytes T et B, et de cellules dendritiques dans les espaces périvasculaires pulmonaires et autour des lésions plexiformes de l'HTAP. Il n'est donc pas étonnant de retrouver une augmentation des marqueurs de l'inflammation chez les patients HTAP. L'inflammation est un processus particulièrement étudié dans la pathogénèse de l'HTAP depuis que des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine IL1 et l'IL6<sup>401</sup>, du facteur de croissance (PDGF)<sup>402</sup> ou de la protéine des macrophages inflammatoires MIP-1<sup>403</sup> ont été détectés dans les artères pulmonaires et les infiltrats de cellules inflammatoires des patients HTAP. L'augmentation de la sélectine circulante chez les patients atteints d'HTAP a déjà été mise en évidence dans les

travaux de Smadja et coll<sup>404</sup>. L'augmentation de cette protéine au niveau tissulaire, coïncide avec la présence d'un endothélium activé favorisant ainsi la dysfonction endothéliale.

A l'inverse de l'HTAP, des marqueurs de l'inflammation sont régulés à la baisse dans la MVOP comme la selectine E, la selectine L et CD14. Etant donné que Perros et coll ont démontré une baisse de niveau des lymphocytes T cytolytiques chez les patients MVOP<sup>205</sup>, nos résultats sont cohérents et suggèrent qu'une dérégulation immunitaire pourrait participer à la physiopathologie de la MVOP. Le rôle de GCN2 dans ce processus reste encore à élucider.

En résumé, ce projet nous a permis d'explorer de nouvelles pistes pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis à l'œuvre dans la MVOP. Même si de nombreuses expérimentations sont encore nécessaire pour établir les véritables différences moléculaires entre l'HTAP et la MVOP, nous avons pu confirmer la baisse d'expression de MMP9 et la dérégulation immunitaire, présentes uniquement chez les patients atteints de MVOP. L'étude des similitudes a, quant à elle, permis de mettre en exergue la présence de certains marqueurs comme la protéine endostatine, étudiée dans l'HTAP et retrouvée dans la MVOP. Des recherches plus approfondies, dans la MVOP, restent à mener.

La limite principale de ce projet réside dans le faible nombre d'échantillons par groupe expérimental. Il se peut que nous omettions certaines voies essentielles à cause de notre faible puissance statistique ou qu'au contraire nous surévaluions la régulation de certains gènes. De plus, nous avons remarqué que l'expression des gènes des échantillons d'HTAP sont très hétérogènes. Les patients étudiés étant atteints d'HTAP de type idiopathique, ils présentent probablement des différences physiopathologiques dues à des facteurs déclenchants très hétérogènes.

## Discussion sur l'ensemble des résultats

Pour discuter l'ensemble des résultats obtenus, nous devons comparer les résultats du rat  $Gcn2^{-/-}$  avec les résultats de l'être l'humain. Cependant il est important de noter que l'absence de MVOP chez le rat fait perdre de la pertinence à cette comparaison. C'est donc avec une certaine réserve et prudence que nous considérerons le contenu de ce chapitre.

En raison de lésions hépatiques et de l'état général du rat, l'expérimentation doit être arrêtée 3 jours après l'injection d'ASNase, ce qui correspond à un temps trop court pour le développement d'un remodelage vasculaire. Ainsi, notre hypothèse initiale est que les dérégulations géniques observées dans les rats  $Gcn2^{-/-}$  traités à l'ASNase pouvaient constituer des mécanismes physiopathologiques du développement de la MVOP.

L'augmentation de certains facteurs, déjà étudiés pour leur participation dans le remodelage vasculaire de l'HTAP, est présente chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase. C'est le cas de l'augmentation de l'expression de MYD88 qui a aussi été retrouvée, au niveau protéique, chez les patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>405</sup>. L'inflammation périvasculaire est une caractéristique pathologique importante dans la plupart des modèles animaux d'HP ainsi que chez les patients souffrant d'HTAP. Plusieurs études s'accordent à reconnaître le rôle fonctionnel de l'inflammation périvasculaire dans l'initiation et/ou la progression de l'HTAP et du remodelage vasculaire pulmonaire<sup>316,406</sup>. On peut supposer qu'à plus long terme, l'inflammation observée chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase puisse aboutir à un remodelage vasculaire, mais nous n'avons aucun argument expérimental soutenant cette hypothèse.

Comme on pouvait s'y attendre, la comparaison entre le transcriptome humain des patients MVOP et du rat  $Gcn2^{-/-}$  sous ASNase, montre une grande disparité entre les deux espèces et les deux conditions expérimentales ou pathologiques. En effet, on observe des voies de signalisation très différentes, voir opposées, entre les rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase et les patients MVOP. Une des différences les plus marquantes est l'activation de l'inflammation chez les rats  $Gcn2^{-/-}$  ASNase alors que cette voie est inhibée chez les patients MVOP. Les patients étudiés ayant atteint un stade terminal de la maladie, nous pouvons supposer que les gènes différentiellement exprimés se modifient au cours de de la maladie. Les différences d'expression des protéines liées à l'ISR dans l'étude de la cinétique de la MVOP chez les rats

traités à la mitomycin-C appuient l'hypothèse de variation du niveau d'expression des gènes au cours de l'évolution de la maladie et du modèle animal<sup>172</sup>.

La baisse de l'inflammation constaté chez les patients MVOP est difficile à associer à la perte de fonction de GCN2. En effet, nos données ainsi que les données de la littérature, indiquent un rôle protecteur de GCN2 contre l'inflammation lors d'un stress métabolique ou inflammatoire. On peut supposer que GCN2 a d'autres fonctions que celle de détecter un manque en acide aminé, même si différents mécanismes peuvent conduire à son induction (déficit en acides aminés ou consommation excessive intracellulaire). De plus, nos résultats sur les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup> prouvent que des dérégulations s'installent même en condition basale avec l'apparition d'une population T<sub>LAG3</sub> suggérant que GCN2 pourrait avoir un rôle particulièrement important dans le développement des lymphocytes T. Nous pouvons émettre l'hypothèse, de façon cohérente avec les données de Perros et coll montrant que les patients MVOP ont une diminution des lymphocytes T cytotoxiques<sup>205</sup>, que la perte de fonction de GCN2 induit un dérèglement du système immunitaire adaptatif chez les patients MVOP.

Le modèle de rat déficient en *Gcn2* présente une différence majeure avec les sujets humains porteurs d'une déficience biallélique en *Gcn2*, car la MVOP grave survient généralement tôt dans la vie (des cas de nouveau-nés ont été répertoriés), et aucun facteur déclenchant la MVOP chez le rat n'a été identifié. Nous ne pouvons pas exclure l'existence d'un facteur inducteur spécifique et non identifié impliqué chez l'homme auquel les rats expérimentaux n'auraient pas été exposés bien que nous ayons expérimenté plusieurs conditions pour induire la MVOP. Une autre hypothèse serait l'absence, chez le rat (et la souris), d'un facteur inflammatoire spécifiquement impliqué dans le développement du remodelage vasculaire présent chez l'homme.

# Conclusion

---



Au terme de ces trois ans de doctorat, nous avons pu réaliser deux projets ayant pour objectif final de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la MVOP héréditaire liés à la perte de fonction de GCN2.

Nous nous sommes, tout d'abord, focalisés sur les mécanismes mis en jeu chez le rat  $Gcn2^{-/-}$  en condition basale ou soumis à un stress métabolique ou non. La découverte d'une population de lymphocytes T exprimant le marqueur LAG3 unique au  $Gcn2^{-/-}$  en condition basale montre que GCN2 n'est pas seulement un détecteur de manque en acides aminés. Nous supposons qu'il joue un rôle clé dans le développement des lymphocytes T autant dans la différenciation que dans la fonction cytotoxique des lymphocytes activés. Sous stress métabolique, nous montrons le rôle protecteur de  $Gcn2$  contre l'inflammation pulmonaire. L'afflux de neutrophiles et de monocytes dans les poumons de rats  $Gcn2^{-/-}$  sous ASNase est cohérent avec l'augmentation des médiateurs de l'inflammation comme les interleukines, les cytokines et les chimiokines, et les acteurs de l'inflammation, comme la voie des TLRs, observés en RNAseq. Nous proposons un mécanisme centré autour de l'apoptose pour le déclenchement de l'inflammation où la calprotectine joue un rôle central dans l'activation de la voie des TLR et l'attraction des neutrophiles.

Le projet sur les échantillons humains a permis de mettre en évidence les dérégulations géniques mis en place au stade terminal de la MVOP. Le dysfonctionnement endothélial, similaire à celui observé dans l'HTAP, et une baisse d'activité de la voie TIE2, sont possiblement impliqués dans la MVOP. Des différences sont notamment mises en évidence par la baisse d'expression de MMP9 et la baisse des marqueurs de l'inflammation dans la MVOP par rapport à l'HTAP.

En résumé, nous n'avons pas mis en place de modèle murin pour la MVOP mais nos résultats mettent en évidence un nouveau rôle de GCN2 dans la régulation des lymphocytes T. La clé du déclenchement de la MVOP lié à la perte de fonction de GCN2 réside potentiellement dans la dérégulation du système immunitaire adaptatif plutôt que dans la carence en acides aminés.



# Perspectives

---



Plus de 7 ans après l'identification du gène EIF2AK4 à l'origine de la MVOPh, le mécanisme conduisant à la MVOP, une forme majeure et particulière de remodelage vasculaire pulmonaire dû à une perte de fonction du gène, n'est toujours pas connu malgré les efforts réalisés par notre équipe et d'autres groupes dans le monde.

Bien qu'il faille noter que la MVOP représente une entité très rare et souvent mal diagnostiquée, une des limites du projet humain réside essentiellement dans le peu d'échantillons malades analysés par groupe (n=4). L'idéal serait d'augmenter le nombre d'échantillons tout en complétant avec d'autres groupes d'hypertension pulmonaire comme l'HTAP héréditaire avec des patients porteurs de la mutation BMPR2 ou la MVOP sporadique.

La discordance majeure observée entre les conséquences du déficit complet en GCN2 chez l'homme et les murins (puisque les murins ne développent pas de MVOP) est une énigme dont la résolution permettrait d'avancer considérablement dans la compréhension de la maladie. Nous avons testé les différences environnementales entre les deux espèces mais nos résultats n'ont pas été concluants. Nous pouvons supposer que des différences d'espèces sur les médiateurs de l'immunité pourraient être en cause, car certains médiateurs ne sont pas présents chez les murins alors qu'ils sont présents chez l'homme.

Un des points majeurs de notre étude est la découverte de la population T<sub>LAG3</sub> présente à l'état basal chez les rats *Gcn2*<sup>-/-</sup>. Le but ultime serait d'associer cette augmentation de lymphocyte T au déclenchement de la maladie. Pour cela, il faudrait tout d'abord vérifier les niveaux d'expression de LAG3 chez les patients MVOP héréditaire. Différentes méthodes se présentent à nous : la cytométrie de flux s'il y a la possibilité de travailler sur des échantillons de poumons en sortie de bloc opératoire, l'immunofluorescence et/ou le western blot. Cependant, si nous voulons réellement comparer des échantillons de rat *Gcn2*<sup>-/-</sup> à l'état basal et des échantillons humains, l'idéal serait d'obtenir des échantillons de patients porteurs de la mutation mais qui n'ont pas encore déclenché la maladie. Etant donné que c'est une maladie très rare et difficile à diagnostiquer, il y a peu de chance d'avoir accès à ce genre d'échantillon. L'analyse des coupes de poumons des échantillons MVOP héréditaire nous permettrait de vérifier la présence de neutrophiles chez ces patients. Si c'est le cas, on pourrait alors mesurer le niveau d'expression de la calprotectine par immunofluorescence ou par ELISA.

D'autres modèles animaux peuvent être testés mais leur manipulation serait délicate. L'équipe du laboratoire avait débuté une collaboration sur le poisson zèbre qui a montré des anomalies vasculaires par injection des œufs avec des morpholinos inhibant l'activité de l'orthologue de GCN2 pendant le développement. Malheureusement l'expérimentation n'a pu être menée à bien, faute de financement.

L'inactivation ciblée du gène EIF2AK4 pourrait être réalisée par la technique CrisPR-CAS9 dans d'autres espèces de mammifères mais les coûts de l'expérimentation peuvent être rédhibitoires.

Enfin, nous avons mis au point des cellules iPS humaines, dont le gène EIF2AK4 a été inactivé par la technique CrispR-CAS9, redifférenciées en cellules endothéliales. Le manque de temps n'a pas permis d'achever les expériences moléculaires prévues sur ce modèle.

Il existe donc de nombreuses pistes pour disposer d'un modèle de la maladie qui permettra d'en étudier les différentes étapes et mettre au point de nouveaux traitements spécifiques.

# Bibliographie

---



1. Nameki N, Yoneyama M, Koshiba S, Tochio N, Inoue M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Harada T, Saito K, Kobayashi N, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Matsuda N, Sakagami N, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Hirota H, Osanai T, Tanaka A, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kinoshita K, Güntert P, Kigawa T, Yokoyama S. Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein Sci.* 2004;13:2089–2100.
2. Garcia-Barrio M, Dong J, Ufano S, Hinnebusch AG. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2 $\alpha$  kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* 2000;19:1887–1899.
3. He H, Singh I, Wek SA, Dey S, Baird TD, Wek RC, Georgiadis MM. Crystal Structures of GCN2 Protein Kinase C-terminal Domains Suggest Regulatory Differences in Yeast and Mammals. *J Biol Chem.* 2014;289:15023–15034.
4. Padyana AK, Qiu H, Roll-Mecak A, Hinnebusch AG, Burley SK. Structural Basis for Autoinhibition and Mutational Activation of Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Protein Kinase GCN2. *J Biol Chem.* 2005;280:29289–29299.
5. Hinnebusch AG. Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81:6442–6446.
6. Berlanga JJ, Santoyo J, de Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur J Biochem.* 1999;265:754–762.
7. Dever TE, Chen JJ, Barber GN, Cigan AM, Feng L, Donahue TF, London IM, Katze MG, Hinnebusch AG. Mammalian eukaryotic initiation factor 2  $\alpha$  kinases functionally substitute for GCN2 protein kinase in the GCN4 translational control mechanism of yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90:4616–4620.
8. Grallert B, Boye E. GCN2, an old dog with new tricks. *Biochem Soc Trans.* 2013;41:1687–1691.
9. Wek RC, Jiang H-Y, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans.* 2006;34:7–11.
10. Kwon NH, Kang T, Lee JY, Kim HH, Kim HR, Hong J, Oh YS, Han JM, Ku MJ, Lee SY, Kim S. Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:19635–19640.
11. Ko Y-G, Kang Y-S, Kim E-K, Park SG, Kim S. Nucleolar Localization of Human Methionyl-tRNA Synthetase and Its Role in Ribosomal RNA Synthesis. *J Cell Biol.* 2000;149:567–574.
12. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:827–835.

13. Deval C, Chaveroux C, Maurin A-C, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways: Regulation of gene expression by amino acid limitation. *FEBS J.* 2009;276:707–718.
14. Lageix S, Zhang J, Rothenburg S, Hinnebusch AG. Interaction between the tRNA-Binding and C-Terminal Domains of Yeast Gcn2 Regulates Kinase Activity In Vivo. *PLoS Genet.* 2015;11:e1004991.
15. Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG. Autophosphorylation in the Activation Loop Is Required for Full Kinase Activity In Vivo of Human and Yeast Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinases PKR and GCN2. *MOL CELL BIOL.* 1998;18:16.
16. Qiu H, Garcia-Barrio MT, Hinnebusch AG. Dimerization by Translation Initiation Factor 2 Kinase GCN2 Is Mediated by Interactions in the C-Terminal Ribosome-Binding Region and the Protein Kinase Domain. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2697–2711.
17. Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA, Dittmar KA, Freimoser F, Pan T, Wek RC. Genome-wide Analysis of tRNA Charging and Activation of the eIF2 Kinase Gcn2p. *J Biol Chem.* 2009;284:25254–25267.
18. Misra J, Holmes MJ, T. Mirek E, Langevin M, Kim H-G, Carlson KR, Watford M, Dong XC, Anthony TG, Wek RC. Discordant regulation of eIF2 kinase GCN2 and mTORC1 during nutrient stress. *Nucleic Acids Res.* 2021;49:5726–5742.
19. Wek SA, Zhu S, Wek RC. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol.* 1995;15:4497–4506.
20. Marton MJ, Crouch D, Hinnebusch AG. GCN1, a translational activator of GCN4 in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 by protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol.* 1993;13:3541–3556.
21. Garcia-Barrio M. Association of GCN1-GCN20 regulatory complex with the N-terminus of eIF2alpha kinase GCN2 is required for GCN2 activation. *EMBO J.* 2000;19:1887–1899.
22. Hinnebusch AG. A hierarchy of trans-acting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1985;5:2349–2360.
23. Castilho BA, Shanmugam R, Silva RC, Ramesh R, Himme BM, Sattlegger E. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2014;1843:1948–1968.
24. Ishimura R, Nagy G, Dotu I, Chuang JH, Ackerman SL. Activation of GCN2 kinase by ribosome stalling links translation elongation with translation initiation. *eLife.* 2016;5:e14295.

25. Ramirez M, Wek RC, Hinnebusch AG. Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1991;11:3027–3036.
26. Inglis AJ, Masson GR, Shao S, Perisic O, McLaughlin SH, Hegde RS, Williams RL. Activation of GCN2 by the ribosomal P-stalk. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116:4946–4954.
27. Lee K-M, Yu CW-H, Chan DS-B, Chiu TY-H, Zhu G, Sze K-H, Shaw P-C, Wong K-B. Solution structure of the dimerization domain of ribosomal protein P2 provides insights for the structural organization of eukaryotic stalk. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:5206–5216.
28. Harding HP, Ordonez A, Allen F, Parts L, Inglis AJ, Williams RL, Ron D. The ribosomal P-stalk couples amino acid starvation to GCN2 activation in mammalian cells. *eLife*. 2019;8:e50149.
29. Zaborske JM, Narasimhan J, Jiang L, Wek SA, Dittmar KA, Freimoser F, Pan T, Wek RC. Genome-wide analysis of tRNA charging and activation of the eIF2 kinase Gcn2p. *J Biol Chem*. 2009;284:25254–25267.
30. Hao S. Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex. *Science*. 2005;307:1776–1778.
31. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vatter KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR. The GCN2 eIF2 $\alpha$  Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6681–6688.
32. Wilson GJ, Bunpo P, Cundiff JK, Wek RC, Anthony TG. The eukaryotic initiation factor 2 kinase GCN2 protects against hepatotoxicity during asparaginase treatment. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2013;305:E1124–E1133.
33. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Indoleamine 2,3-dioxygenase depletes tryptophan, activates general control non-derepressible 2 kinase and down-regulates key enzymes involved in fatty acid synthesis in primary human CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunology*. 2015;146:292–300.
34. Yang R, Wek SA, Wek RC. Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Mol Cell Biol*. 2000;20:2706–2717.
35. Rolfes RJ, Hinnebusch AG. Translation of the yeast transcriptional activator GCN4 is stimulated by purine limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2. *Mol Cell Biol*. 1993;13:5099–5111.
36. Hueso G, Aparicio-Sanchis R, Montesinos C, Lorenz S, Murguía JR, Serrano R. A novel role for protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress. *Biochem J*. 2012;441:255–264.
37. Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras A-C, Berlanga JJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D, Sonenberg N. Activation of GCN2 in UV-Irradiated Cells Inhibits Translation. *Curr Biol*. 2002;12:1279–1286.

38. Lu W, László CF, Miao Z, Chen H, Wu S. The Role of Nitric-oxide Synthase in the Regulation of UVB Light-induced Phosphorylation of the  $\alpha$  Subunit of Eukaryotic Initiation Factor 2. *J Biol Chem*. 2009;284:24281–24288.
39. Berlanga JJ, Ventoso I, Harding HP, Deng J, Ron D, Sonenberg N, Carrasco L, de Haro C. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J*. 2006;25:1730–1740.
40. Cosnefroy O, Jaspert A, Calmels C, Parissi V, Fleury H, Ventura M, Reigadas S, Andréola M-L. Activation of GCN2 upon HIV-1 infection and inhibition of translation. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:2411–2421.
41. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Mol Cell*. 2003;11:619–633.
42. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell*. 2000;5:897–904.
43. Suragani RNVS, Zachariah RS, Velazquez JG, Liu S, Sun C-W, Townes TM, Chen J-J. Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis. *Blood*. 2012;119:5276–5284.
44. Clemens MJ, Elia A. The Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR: Structure and Function. *J Interferon Cytokine Res*. 1997;17:503–524.
45. Berlanga JJ, Santoyo J, de Haro C. Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase. *Eur J Biochem*. 1999;265:754–762.
46. Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A, Gorman AM. The integrated stress response. *EMBO Rep*. 2016;17:1374–1395.
47. Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, Lu P, Zhang Y, Harding HP, Ron D. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 $\alpha$  phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol*. 2003;163:767–775.
48. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-Mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *J Cell Biol*. 2001;153:1011–1022.
49. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10:a033092.
50. Klann E, Dever TE. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:931–942.

51. Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG. Phosphorylation of initiation factor 2 $\alpha$  by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell*. 1992;68:585–596.
52. Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG. Tight Binding of the Phosphorylated Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2 ) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation. *Mol Cell Biol*. 2001;21:5018–5030.
53. Holcik M, Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:318–327.
54. Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 2005;169:871–884.
55. Ganguly K, Giddaluru J, August A, Khan N. Post-transcriptional Regulation of Immunological Responses through Riboclustering. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 22];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00161/abstract>
56. Zhou D, Palam LR, Jiang L, Narasimhan J, Staschke KA, Wek RC. Phosphorylation of eIF2 Directs ATF5 Translational Control in Response to Diverse Stress Conditions. *J Biol Chem*. 2008;283:7064–7073.
57. Lee Y-Y, Cevallos RC, Jan E. An Upstream Open Reading Frame Regulates Translation of GADD34 during Cellular Stresses That Induce eIF2 $\alpha$  Phosphorylation. *J Biol Chem*. 2009;284:6661–6673.
58. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:11269–11274.
59. Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:11269–11274.
60. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:436–443.
61. Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:14–21.
62. Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20:436–443.
63. Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ. Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J*. 1999;339 ( Pt 1):135–141.

64. Bunpo P, Dudley A, Cundiff JK, Cavener DR, Wek RC, Anthony TG. GCN2 Protein Kinase Is Required to Activate Amino Acid Deprivation Responses in Mice Treated with the Anti-cancer Agent L-Asparaginase. *J Biol Chem*. 2009;284:32742–32749.
65. Lee J-I, Dominy JE, Sikalidis AK, Hirschberger LL, Wang W, Stipanuk MH. HepG2/C3A cells respond to cysteine deprivation by induction of the amino acid deprivation/integrated stress response pathway. *Physiol Genomics*. 2008;33:218–229.
66. Chen H, Pan Y-X, Dudenhausen EE, Kilberg MS. Amino Acid Deprivation Induces the Transcription Rate of the Human Asparagine Synthetase Gene through a Timed Program of Expression and Promoter Binding of Nutrient-responsive Basic Region/Leucine Zipper Transcription Factors as Well as Localized Histone Acetylation. *J Biol Chem*. 2004;279:50829–50839.
67. Pan Y-X, Chen H, Kilberg MS. Interaction of RNA-binding Proteins HuR and AUF1 with the Human ATF3 mRNA 3'-Untranslated Region Regulates Its Amino Acid Limitation-induced Stabilization. *J Biol Chem*. 2005;280:34609–34616.
68. Su N, Kilberg MS. C/EBP Homology Protein (CHOP) Interacts with Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Negatively Regulates the Stress-dependent Induction of the Asparagine Synthetase Gene. *J Biol Chem*. 2008;283:35106–35117.
69. Lopez AB, Wang C, Huang CC, Yaman I, Li Y, Chakravarty K, Johnson PF, Chiang C-M, Snider MD, Wek RC, Hatzoglou M. A feedback transcriptional mechanism controls the level of the arginine/lysine transporter cat-1 during amino acid starvation. *Biochem J*. 2007;402:163–173.
70. Balasubramanian MN, Butterworth EA, Kilberg MS. Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2013;304:E789–E799.
71. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Kennedy K, Hai T, Bolouri H, Aderem A. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2006;441:173–178.
72. Bröer S, Gauthier-Coles G. Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport. *J Nutr*. 2021;nxab342.
73. Panosyan EH, Grigoryan RS, Avramis IA, Seibel NL, Gaynon PS, Siegel SE, Fingert HJ, Avramis VI. Deamination of glutamine is a prerequisite for optimal asparagine deamination by asparaginases in vivo (CCG-1961). *Anticancer Res*. 2004;24:1121–1125.
74. Raetz EA, Salzer WL. Tolerability and Efficacy of L-Asparaginase Therapy in Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia: *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32:554–563.
75. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239–257.

76. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43:582–592.
77. Jiang H-Y, Wek RC. GCN2 phosphorylation of eIF2 $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B in response to UV irradiation. *Biochem J.* 2005;385:371–380.
78. Lundqvist J, Yde CW, Lykkesfeldt AE. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and NF $\kappa$ B signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Steroids.* 2014;85:30–35.
79. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, Koumenis C. The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* 2010;29:2082–2096.
80. Martinet W, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. Amino Acid Deprivation Induces Both Apoptosis and Autophagy in Murine C2C12 Muscle Cells. *Biotechnol Lett.* 2005;27:1157–1163.
81. Muaddi H, Majumder M, Peidis P, Papadakis AI, Holcik M, Scheuner D, Kaufman RJ, Hatzoglou M, Koromilas AE. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  at Serine 51 Is an Important Determinant of Cell Survival and Adaptation to Glucose Deficiency. *Mol Biol Cell.* 2010;21:3220–3231.
82. Okada A, Nangaku M, Jao T-M, Maekawa H, Ishimono Y, Kawakami T, Inagi R. D-serine, a novel uremic toxin, induces senescence in human renal tubular cells via GCN2 activation. *Sci Rep.* 2017;7:11168.
83. Jiang H-Y, Wek RC. Phosphorylation of the  $\alpha$ -Subunit of the Eukaryotic Initiation Factor-2 (eIF2 $\alpha$ ) Reduces Protein Synthesis and Enhances Apoptosis in Response to Proteasome Inhibition. *J Biol Chem.* 2005;280:14189–14202.
84. B'chir W, Chaveroux C, Carraro V, Averous J, Maurin A-C, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Fafournoux P, Bruhat A. Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal.* 2014;26:1385–1391.
85. McCullough KD, Martindale JL, Klotz L-O, Aw T-Y, Holbrook NJ. Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1249–1259.
86. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11:390–402.
87. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP. Neuronal Apoptosis Induced by Endoplasmic Reticulum Stress Is Regulated by ATF4-CHOP-Mediated Induction of the Bcl-2 Homology 3-Only Member PUMA. *J Neurosci.* 2010;30:16938–16948.

88. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim. *Cell*. 2007;129:1337–1349.
89. Kim H, Tu H-C, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ-D, Cheng EH-Y. Stepwise Activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA Initiates Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell*. 2009;36:487–499.
90. Lu Z, Xu X, Fassett J, Kwak D, Liu X, Hu X, Wang H, Guo H, Xu D, Yan S, McFalls EO, Lu F, Bache RJ, Chen Y. Loss of the Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinase General Control Nonderepressible 2 Protects Mice From Pressure Overload–Induced Congestive Heart Failure Without Affecting Ventricular Hypertrophy. *Hypertension*. 2014;63:128–135.
91. Yin Z, Pascual C, Klionsky D. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*. 2016;3:588–596.
92. Collier JJ, Guissart C, Oláhová M, Sasorith S, Piron-Prunier F, Suomi F, Zhang D, Martinez-Lopez N, Leboucq N, Bahr A, Azzarello-Burri S, Reich S, Schöls L, Polvikoski TM, Meyer P, Larrieu L, Schaefer AM, Alsaif HS, Alyamani S, Zuchner S, Barbosa IA, Deshpande C, Pyle A, Rauch A, Synofzik M, Alkuraya FS, Rivier F, Ryten M, McFarland R, Delahodde A, McWilliams TG, Koenig M, Taylor RW. Developmental Consequences of Defective ATG7-Mediated Autophagy in Humans. *N Engl J Med*. 2021;384:2406–2417.
93. Mortimore GE, Schworer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature*. 1977;270:174–176.
94. Deval C, Chaveroux C, Maurin A-C, Cherasse Y, Parry L, Carraro V, Milenkovic D, Ferrara M, Bruhat A, Jousse C, Fafournoux P. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways: Regulation of gene expression by amino acid limitation. *FEBS J*. 2009;276:707–718.
95. Mortimore GE, Reeta Pösö A. [58] Amino acid control of intracellular protein degradation [Internet]. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 1988 [cited 2020 Apr 15]. p. 461–476. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687988660605>
96. B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:7683–7699.
97. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*. 2002;110:163–175.
98. Oh WJ, Jacinto E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*. 2011;10:2305–2316.

99. Limon JJ, Fruman DA. Akt and mTOR in B Cell Activation and Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Apr 21];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00228/abstract>
100. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:307–318.
101. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and Metabolism. *Science*. 2010;330:1344–1348.
102. Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;45:72–82.
103. Jewell JL, Kim YC, Russell RC, Yu F-X, Park HW, Plouffe SW, Tagliabracci VS, Guan K-L. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science*. 2015;347:194–198.
104. Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T. Novel G Proteins, Rag C and Rag D, Interact with GTP-binding Proteins, Rag A and Rag B. *J Biol Chem*. 2001;276:7246–7257.
105. Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol*. 2003;5:566–571.
106. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320:1496–1501.
107. Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient regulation of the mTOR Complex 1 signaling pathway. *Mol Cells*. 2013;35:463–473.
108. Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, McGrath BC, Cavener DR, McNurlan MA, Wek RC. Preservation of Liver Protein Synthesis during Dietary Leucine Deprivation Occurs at the Expense of Skeletal Muscle Mass in Mice Deleted for eIF2 Kinase GCN2. *J Biol Chem*. 2004;279:36553–36561.
109. Xiao F, Huang Z, Li H, Yu J, Wang C, Chen S, Meng Q, Cheng Y, Gao X, Li J, Liu Y, Guo F. Leucine Deprivation Increases Hepatic Insulin Sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK Pathways. *Diabetes*. 2011;60:746–756.
110. Cherkasova VA. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  kinase GCN2. *Genes Dev*. 2003;17:859–872.
111. Wengrod J, Wang D, Weiss S, Zhong H, Osman I, Gardner LB. Phosphorylation of eIF2 triggered by mTORC1 inhibition and PP6C activation is required for autophagy and is aberrant in PP6C-mutated melanoma. *Sci Signal*. 2015;8:ra27–ra27.
112. Nikonorova IA, Mirek ET, Signore CC, Goudie MP, Wek RC, Anthony TG. Time-resolved analysis of amino acid stress identifies eIF2 phosphorylation as necessary to inhibit mTORC1 activity in liver. *J Biol Chem*. 2018;293:5005–5015.

113. Averous J, Lambert-Langlais S, Mesclon F, Carraro V, Parry L, Jousse C, Bruhat A, Maurin A-C, Pierre P, Proud CG, Fournoux P. GCN2 contributes to mTORC1 inhibition by leucine deprivation through an ATF4 independent mechanism. *Sci Rep*. 2016;6:27698.
114. Ye J, Palm W, Peng M, King B, Lindsten T, Li MO, Koumenis C, Thompson CB. GCN2 sustains mTORC1 suppression upon amino acid deprivation by inducing Sestrin2. *Genes Dev*. 2015;29:2331–2336.
115. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257–290.
116. Kabat AM, Pott J, Maloy KJ. The Mucosal Immune System and Its Regulation by Autophagy. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Aug 24];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00240/abstract>
117. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S24–32.
118. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:S33–S40.
119. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48:202–213.
120. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112:1570–1580.
121. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol*. 2019;20:783–792.
122. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:11–22.
123. Castelo-Branco C, Soveral I. The immune system and aging: a review. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30:16–22.
124. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *Int Rev Immunol*. 2011;30:16–34.
125. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:262–275.
126. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:860–875.
127. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428–435.
128. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81:1–5.

129. Janeway CA, Medzhitov R. INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
130. Brasier AR. The nuclear factor- $\kappa$ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010;86:211–218.
131. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:1–10.
132. Proost P, Struyf S, Van Damme J, Fiten P, Ugarte-Berzal E, Opdenakker G. Chemokine isoforms and processing in inflammation and immunity. *J Autoimmun*. 2017;85:45–57.
133. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem*. 2020;64:423–441.
134. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*. 2019;50:1352–1364.
135. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803–815.
136. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;41:694–707.
137. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res*. 2018;371:531–539.
138. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:159–175.
139. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20:1126–1167.
140. O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:553–565.
141. Le Floc’h N, Melchior D, Obled C. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livest Prod Sci*. 2004;87:37–45.
142. Jiang G, Santos Rocha C, Hirao LA, Mendes EA, Tang Y, Thompson GR, Wong JK, Dandekar S. HIV Exploits Antiviral Host Innate GCN2-ATF4 Signaling for Establishing Viral Replication Early in Infection. *mBio* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 31];8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01518-16>
143. Xia X, Gao Y, Zhang J, Wang L, Zhao S, Che Y, Ao C, Yang H, Wang J, Lei L. Autophagy mediated by arginine depletion activation of the nutrient sensor GCN2 contributes to interferon- $\gamma$ -induced malignant transformation of primary bovine mammary epithelial cells. *Cell Death Discov*. 2016;2:15065.
144. Wallace C, Keast D. Glutamine and macrophage function. *Metabolism*. 1992;41:1016–1020.

145. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:323–350.
146. Carr EL, Kelman A, Wu GS, Gopaul R, Senkevitch E, Aghvanyan A, Turay AM, Frauwirth KA. Glutamine Uptake and Metabolism Are Coordinately Regulated by ERK/MAPK during T Lymphocyte Activation. *J Immunol.* 2010;185:1037–1044.
147. Crawford J, Cohen HJ. The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 1985;124:275–282.
148. Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci.* 1984;81:908–912.
149. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S, Mazza EMC, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol.* 2011;12:870–878.
150. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity.* 2005;22:633–642.
151. Van de Velde L-A, Guo X-ZJ, Barbaric L, Smith AM, Oguin TH, Thomas PG, Murray PJ. Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Rep.* 2016;17:2247–2258.
152. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor  $\zeta$ -Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *J Immunol.* 2006;176:6752–6761.
153. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou D-Y, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2007;117:2570–2582.
154. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013;34:137–143.
155. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood.* 2007;109:1568–1573.
156. Liu H, Huang L, Bradley J, Liu K, Bardhan K, Ron D, Mellor AL, Munn DH, McGaha TL. GCN2-Dependent Metabolic Stress Is Essential for Endotoxemic Cytokine Induction and Pathology. *Mol Cell Biol.* 2014;34:428–438.

157. Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, Koritzinsky M, Madaio MP, McGaha TL. The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112:10774–10779.
158. Ravindran R, Khan N, Nakaya HI, Li S, Loebbermann J, Maddur MS, Park Y, Jones DP, Chappert P, Davoust J, Weiss DS, Virgin HW, Ron D, Pulendran B. Vaccine Activation of the Nutrient Sensor GCN2 in Dendritic Cells Enhances Antigen Presentation. *Science*. 2014;343:313–317.
159. Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, Machiah DK, Lawson B, Hakimpour P, Wang Y, Li S, Sharma P, Kaufman RJ, Martinez J, Pulendran B. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*. 2016;531:523–527.
160. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, Khan RA, Bhat SY, Qureshi IA, Manavathi B, Khan AA, August A, Hasnain SE, Khan N. Amino acid starvation sensing dampens IL-1 $\beta$  production by activating riboclustering and autophagy. *PLoS Biol*. 2018;16:e2005317.
161. Höra J. Zur Histologie der klinischen" primären Pulmonalsklerose.". Bergmann. 1943;
162. Heath D, Segel N, Bishop J. Pulmonary veno-occlusive disease. *Circulation*. 1966;34:242–248.
163. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J*. 2015;46:903–975.
164. Mandel J, Mark EJ, Hales CA. Pulmonary Venous Occlusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1964–1973.
165. Montani D, Lau EM, Dorfmüller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
166. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:S25–S32.
167. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, Chelghoum N, Coulet F, Bonnet D, Dorfmüller P, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Tregouët D-A, Humbert M,

- Soubrier F. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2014;46:65–69.
168. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2019;53:1801913.
169. Lantuéjoul S, Sheppard MN, Corrin B, Burke MM, Nicholson AG. Pulmonary Venocclusive Disease and Pulmonary Capillary Hemangiomatosis: A Clinicopathologic Study of 35 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:850–857.
170. Daraban AM, Enache R, Predescu L, Platon P, Constantinescu T, Mihai C, Coman IM, Ginghină C, Jurcuț R. Pulmonary veno-occlusive disease: a rare cause of pulmonary hypertension in systemic sclerosis. Case presentation and review of the literature. *Rom J Intern Med.* 2015;53:175–183.
171. Günther S, Perros F, Rautou P-E, Girerd B, Ghigna M-R, Cazals-Hatem D, Lau EM, Dorfmueller P, Sitbon O, Valla DC, Humbert M, Montani D. Understanding the Similarities and Differences between Hepatic and Pulmonary Venocclusive Disease. *Am J Pathol.* 2019;189:1159–1175.
172. 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 Venocclusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation.* 2015;132:834–847.
173. Montani D, Achouh L, Dorfmueller P, Le Pavec J, Sztrymf B, Tchérakian C, Rabiller A, Haque R, Sitbon O, Jaïs X, Darteville P, Maître S, Capron F, Musset D, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary Venocclusive Disease: Clinical, Functional, Radiologic, and Hemodynamic Characteristics and Outcome of 24 Cases Confirmed by Histology. *Medicine (Baltimore).* 2008;87:220–233.
174. Montani D, Girerd B, Jaïs X, Levy M, Amar D, Savale L, Dorfmueller P, Seferian A, Lau EM, Eyries M, Le Pavec J, Parent F, Bonnet D, Soubrier F, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary venocclusive disease: a population-based study. *Lancet Respir Med.* 2017;5:125–134.
175. Humbert M, Gerry Coghlan J, Khanna D. Early detection and management of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir Rev.* 2012;21:306–312.
176. Lau EMT, Humbert M, Celermajer DS. Early detection of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12:143–155.
177. Holcomb BW, Loyd JE, Ely EW, Johnson J, Robbins IM. Pulmonary venocclusive disease: a case series and new observations. *Chest.* 2000;118:1671–1679.
178. Rabiller A. Occult alveolar haemorrhage in pulmonary venocclusive disease. *Eur Respir J.* 2006;27:108–113.

179. Montani D, Achouh L, Dorfmüller P, Le Pavec J, Sztrymf B, Tchérakian C, Rabiller A, Haque R, Sitbon O, Jais X, Dartevielle P, Maître S, Capron F, Musset D, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Clinical, Functional, Radiologic, and Hemodynamic Characteristics and Outcome of 24 Cases Confirmed by Histology. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87:220–233.
180. Holcomb BW, Loyd JE, Ely EW, Johnson J, Robbins IM. Pulmonary veno-occlusive disease: a case series and new observations. *Chest*. 2000;118:1671–1679.
181. Humbert M, Tre SM, Capron F, Rain B, Musset D, Simonneau G. Pulmonary Edema Complicating Continuous Intravenous Prostacyclin in Pulmonary Capillary Hemangiomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1681–1685.
182. Lantuéjoul S, Sheppard MN, Corrin B, Burke MM, Nicholson AG. Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: a clinicopathologic study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:850–857.
183. Montani D, Jais X, Dorfmüller P, Simonneau G, Sitbon O, Humbert M. Goal-oriented therapy in pulmonary veno-occlusive disease: a word of caution. *Eur Respir J*. 2009;34:1204–1206.
184. Davis LL, De Boisblanc BP, Glynn CE, Summer WR, Ramirez C. Effect of Prostacyclin on Microvascular Pressures in a Patient With Pulmonary Veno-Occlusive Disease. *Chest*. 1995;108:1754–1756.
185. Okumura H, Nagaya N, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, Fukuhara S, Yutani C. Effects of Continuous IV Prostacyclin in a Patient With Pulmonary Veno-occlusive Disease. *Chest*. 2002;122:1096–1098.
186. Ogawa A, Miyaji K, Yamadori I, Shinno Y, Miura A, Kusano KF, Ito H, Date H, Matsubara H. Safety and Efficacy of Epoprostenol Therapy in Pulmonary Veno-Occlusive Disease and Pulmonary Capillary Hemangiomatosis. *Circ J*. 2012;76:1729–1736.
187. Hoepfer MM, Eschenbruch C, Zink-Wohlfart C, Schulz A, Markworth S, Pohl K, Fabel H. Effects of inhaled nitric oxide and aerosolized iloprost in pulmonary veno-occlusive disease. *Respir Med*. 1999;93:62–64.
188. Barreto AC, Franchi SM, Castro CRP, Lopes AA. One-year follow-up of the effects of sildenafil on pulmonary arterial hypertension and veno-occlusive disease. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38:185–195.
189. Kuroda T, Hirota H, Masaki M, Sugiyama S, Oshima Y, Terai K, Ito A, Yamauchi-Takahara K. Sildenafil as Adjunct Therapy to High-Dose Epoprostenol in a Patient with Pulmonary Veno-Occlusive Disease. *Heart Lung Circ*. 2006;15:139–142.
190. Wille KM, Sharma NS, Kulkarni T, Lammi MR, Barney JB, Bellot SC, Cantor RS, Naftel DC, Diaz-Guzman E, McGiffin DC. Characteristics of Patients with Pulmonary Venooocclusive Disease Awaiting Transplantation. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11:1411–1418.

191. Gagnadoux F, Capron F, Lebeau B. Pulmonary veno-occlusive disease after neoadjuvant mitomycin chemotherapy and surgery for lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2002;36:213–215.
192. Seguchi M, Hirabayashi N, Fujii Y, Azuno Y, Fujita N, Takeda K, Sato Y, Nishimura M, Yamada K, Oka Y. PULMONARY HYPERTENSION ASSOCIATED WITH PULMONARY OCCLUSIVE VASCULOPATHY AFTER ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION: *Transplantation*. 2000;69:177.
193. Swift GL, Gibbs A, Campbell IA, Wagenvoort CA, Tuthill D. Pulmonary veno-occlusive disease and Hodgkin's lymphoma. *Eur Respir J*. 1993;6:596–598.
194. 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. *Am J Pathol*. 2015;185:356–371.
195. Montani D, Lau EM, Descatha A, Jaïs X, Savale L, Andujar P, Bensefa-Colas L, Girerd B, Zendah I, Le Pavec J, Seferian A, Perros F, Dorfmueller P, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2015;46:1721–1731.
196. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149–2155.
197. Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Smoking: Is it a Risk Factor for Pulmonary Vascular Diseases? *Pulm Circ*. 2012;2:395–396.
198. Tenorio J, Navas P, Barrios E, Fernández L, Nevado J, Quezada CA, López-Meseguer M, Arias P, Mena R, Lobo JL, Alvarez C, Heath K, Escribano-Subías P, Lapunzina P. A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies: *EIF2AK4* mutation causing pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin Genet*. 2015;88:579–583.
199. Lathen C, Zhang Y, Chow J, Singh M, Lin G, Nigam V, Ashraf YA, Yuan JX, Robbins IM, Thistlethwaite PA. ERG-APLN Axis Controls Pulmonary Venule Endothelial Proliferation in Pulmonary Venous Occlusive Disease. *Circulation*. 2014;130:1179–1191.
200. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. The pathology of pulmonary veno-occlusive disease. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1974;364:69–79.
201. Schraufnagel DE, Sekosan M, McGee T, Thakkar MB. Human alveolar capillaries undergo angiogenesis in pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 1996;9:346–350.
202. Best DH, Sumner KL, Smith BP, Damjanovich-Colmenares K, Nakayama I, Brown LM, Ha Y, Paul E, Morris A, Jama MA, Dodson MW, Bayrak-Toydemir P, Elliott CG. *EIF2AK4*

- Mutations in Patients Diagnosed With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2017;151:821–828.
203. Nossent EJ, Antigny F, Montani D, Bogaard HJ, Ghigna MR, Lambert M, de Montpreville VT, Girerd B, Jais X, Savale L, Mercier O, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Noordegraaf AV, Humbert M, Perros F, Dorfmüller P. 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.
  204. Tuder RM, Archer SL, Dorfmüller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Morrell NW. Relevant Issues in the Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D4–D12.
  205. Perros F, Cohen-Kaminsky S, Gambaryan N, Girerd B, Raymond N, Klingelschmitt I, Huertas A, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Humbert M, Dorfmüller P, Montani D. Cytotoxic Cells and Granulysin in Pulmonary Arterial Hypertension and Pulmonary Venocclusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:189–196.
  206. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmüller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2015;131:1006–1018.
  207. Zhang C, Lu W, Luo X, Liu S, Li Y, Zheng Q, Liu W, Wu X, Chen Y, Jiang Q, Zhang Z, Gu G, Chen J, Chen H, Liao J, Liu C, Hong C, Tang H, Sun D, Yang K, Wang J. Mitomycin C induces pulmonary vascular endothelial-to-mesenchymal transition and pulmonary veno-occlusive disease via Smad3-dependent pathway in rats. *Br J Pharmacol*. 2021;178:217–235.
  208. Chen Z, Zhang J, Wei D, Chen J, Yang J. GCN2 Regulates ATF3-p38 MAPK Signaling Transduction in Pulmonary Venocclusive Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2021;107424842110155.
  209. Lathen C, Zhang Y, Chow J, Singh M, Lin G, Nigam V, Ashraf YA, Yuan JX, Robbins IM, Thistlethwaite PA. ERG-APLN Axis Controls Pulmonary Venule Endothelial Proliferation in Pulmonary Venocclusive Disease. *Circulation*. 2014;130:1179–1191.
  210. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D34–D41.
  211. Ling Y, Johnson MK, Kiely DG, Condliffe R, Elliot CA, Gibbs JSR, Howard LS, Pepke-Zaba J, Sheares KKK, Corris PA, Fisher AJ, Lordan JL, Gaine S, Coghlan JG, Wort SJ, Gatzoulis MA, Peacock AJ. Changing Demographics, Epidemiology, and Survival of Incident Pulmonary Arterial Hypertension: Results from the Pulmonary Hypertension Registry of the United Kingdom and Ireland. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:790–796.

212. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier J-F, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. Pulmonary Arterial Hypertension in France: Results from a National Registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1023–1030.
213. Thenappan T, Shah SJ, Rich S, Gomberg-Maitland M. A USA-based registry for pulmonary arterial hypertension: 1982–2006. *Eur Respir J*. 2007;30:1103–1110.
214. Rich S. Primary Pulmonary Hypertension: A National Prospective Study. *Ann Intern Med*. 1987;107:216.
215. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJV, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2007;30:104–109.
216. Larkin EK, Newman JH, Austin ED, Hemnes AR, Wheeler L, Robbins IM, West JD, Phillips JA, Hamid R, Loyd JE. Longitudinal Analysis Casts Doubt on the Presence of Genetic Anticipation in Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:892–896.
217. Gall H, Felix JF, Schneck FK, Milger K, Sommer N, Voswinckel R, Franco OH, Hofman A, Schermuly RT, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Ghofrani HA. The Giessen Pulmonary Hypertension Registry: Survival in pulmonary hypertension subgroups. *J Heart Lung Transplant*. 2017;36:957–967.
218. Bonderman D, Wexberg P, Martischnig AM, Heinzl H, Lang M-B, Sadushi R, Skoro-Sajer N, Lang IM. A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2011;37:1096–1103.
219. Lai Y-C, Potoka KC, Champion HC, Mora AL, Gladwin MT. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. *Circ Res*. 2014;115:115–130.
220. McLaughlin VV, Archer SL, Badesch DB, Barst RJ, Farber HW, Lindner JR, Mathier MA, McGoon MD, Park MH, Rosenson RS, Rubin LJ, Tapson VF, Varga J. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1573–1619.
221. Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL. Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984;70:580–587.
222. Naeije R, Vachiéry J-L. MEDICAL THERAPY OF PULMONARY HYPERTENSION. *Clin Chest Med*. 2001;22:517–527.
223. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351:1425–1436.
224. Sitbon O, Humbert M, Jagot J-L, Taravella O, Fartoukh M, Parent F, Herve P, Simonneau G. Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral

- calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 1998;12:265–270.
225. Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Hervé P, Simonneau G. Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2005;111:3105–3111.
226. Montani D, Savale L, Natali D, Jais X, Herve P, Garcia G, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2010;31:1898–1907.
227. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in Primary Pulmonary Hypertension: The Impact of Epoprostenol Therapy. *Circulation*. 2002;106:1477–1482.
228. Oudiz RJ, Widlitz A, Beckmann XJ, Camanga D, Alfie J, Brundage BH, Barst RJ. Micrococcus-Associated Central Venous Catheter Infection in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2004;126:90–94.
229. Simonneau G, Barst RJ, Galie N, Naeije R, Rich S, Bourge RC, Keogh A, Oudiz R, Frost A, Blackburn SD, Crow JW, Rubin LJ. Continuous Subcutaneous Infusion of Treprostinil, a Prostacyclin Analogue, in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:800–804.
230. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. *The Lancet*. 2001;358:1119–1123.
231. Barst RJ, Langleben D, Badesch D, Frost A, Lawrence EC, Shapiro S, Naeije R, Galie N. Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension With the Selective Endothelin-A Receptor Antagonist Sitaxsentan. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:2049–2056.
232. Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, Badesch DB, McGoon MD, McLaughlin VV, Roecker EB, Gerber MJ, Dufton C, Wiens BL, Rubin LJ. Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy (ARIES) Study 1 and 2. *Circulation*. 2008;117:3010–3019.
233. Galiè N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G. Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2005;353:2148–2157.
234. Humbert M, McLaughlin V, Gibbs JSR, Gomberg-Maitland M, Hoepfer MM, Preston IR, Souza R, Waxman A, Escribano Subias P, Feldman J, Meyer G, Montani D, Olsson KM, Manimaran S, Barnes J, Linde PG, de Oliveira Pena J, Badesch DB. Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2021;384:1204–1215.

235. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA. Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor-II Gene. *Am J Hum Genet.* 2000;67:737–744.
236. Machado RD, Aldred MA, James V, Harrison RE, Patel B, Schwalbe EC, Gruenig E, Janssen B, Koehler R, Seeger W, Eickelberg O, Olschewski H, Gregory Elliott C, Glissmeyer E, Carlquist J, Kim M, Torbicki A, Fijalkowska A, Szewczyk G, Parma J, Abramowicz MJ, Galie N, Morisaki H, Kyotani S, Nakanishi N, Morisaki T, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O, Soubrier F, Coulet F, Morrell NW, Trembath RC. Mutations of the TGF- $\beta$  type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat.* 2006;27:121–132.
237. Tielemans B, Delcroix M, Belge C, Quarck R. TGF $\beta$  and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov Today.* 2019;24:703–716.
238. Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, Chytil A, Minowa O, Noda T, Miyazono K. BMP Type II Receptor Is Required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos. *Dev Biol.* 2000;221:249–258.
239. Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E, Bloch KD. Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor Deletion Reveals BMP Ligand-specific Gain of Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* 2005;280:24443–24450.
240. Kim M-J, Park SY, Chang HR, Jung EY, Munkhjargal A, Lim J-S, Lee M-S, Kim Y. Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2. *BMB Rep.* 2017;50:308–317.
241. Beppu H, Kawabata M, Hamamoto T, Chytil A, Minowa O, Noda T, Miyazono K. BMP Type II Receptor Is Required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos. *Dev Biol.* 2000;221:249–258.
242. Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Dev Camb Engl.* 1996;122:2977–2986.
243. Icli B, Dorbala P, Feinberg MW. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24:241–248.
244. Chan MC, Hilyard AC, Wu C, Davis BN, Hill NS, Lal A, Lieberman J, Lagna G, Hata A. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGF $\beta$  family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *EMBO J.* 2010;29:559–573.
245. Langenfeld EM, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res MCR.* 2004;2:141–149.
246. Tian XY, Yung LH, Wong WT, Liu J, Leung FP, Liu L, Chen Y, Kong SK, Kwan KM, Ng SM, Lai PBS, Yung LM, Yao X, Huang Y. Bone morphogenetic protein-4 induces endothelial cell apoptosis through oxidative stress-dependent p38MAPK and JNK pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:237–244.

247. Evans JDW, Girerd B, Montani D, Wang X-J, Galiè N, Austin ED, Elliott G, Asano K, Grünig E, Yan Y, Jing Z-C, Manes A, Palazzini M, Wheeler LA, Nakayama I, Satoh T, Eichstaedt C, Hinderhofer K, Wolf M, Rosenzweig EB, Chung WK, Soubrier F, Simonneau G, Sitbon O, Gräf S, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Humbert M, Morrell NW. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4:129–137.
248. Yang J, Davies RJ, Southwood M, Long L, Yang X, Sobolewski A, Upton PD, Trembath RC, Morrell NW. Mutations in Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Cause Dysregulation of Id Gene Expression in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells: Implications for Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2008;102:1212–1221.
249. Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC. Altered Growth Responses of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells From Patients With Primary Pulmonary Hypertension to Transforming Growth Factor- $\beta$  1 and Bone Morphogenetic Proteins. *Circulation*. 2001;104:790–795.
250. Lagna G, Ku MM, Nguyen PH, Neuman NA, Davis BN, Hata A. Control of Phenotypic Plasticity of Smooth Muscle Cells by Bone Morphogenetic Protein Signaling through the Myocardin-related Transcription Factors. *J Biol Chem*. 2007;282:37244–37255.
251. Yeo Y, Yi ES, Kim J-M, Jo E-K, Seo S, Kim R-I, Kim KL, Sung J-H, Park SG, Suh W. FGF12 (Fibroblast Growth Factor 12) Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Hypertension*. 2020;76:1778–1786.
252. Yndestad A, Larsen K-O, Øie E, Ueland T, Smith C, Halvorsen B, Sjaastad I, Skjønberg OH, Pedersen TM, Anfinsen O-G, Damås JK, Christensen G, Aukrust P, Andreassen AK. Elevated levels of activin A in clinical and experimental pulmonary hypertension. *J Appl Physiol*. 2009;106:1356–1364.
253. Kudryashova T, Shen Y, Pena A, Cronin E, Okorie E, Goncharov D, Goncharova E. Inhibitory Antibodies against Activin A and TGF- $\beta$  Reduce Self-Supported, but Not Soluble Factors-Induced Growth of Human Pulmonary Arterial Vascular Smooth Muscle Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2018;19:2957.
254. Sun N, Chen Y, Yu F, Zhixin F, Lin J, Sun B, Yu B, Cheng X, Zheng X, Wu B. Monocrotaline pyrrole enhanced bone morphogenetic protein 7 signaling transduced by alternative activin A receptor type 2A in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2019;863:172679.
255. Sudo S, Avsian-Kretchmer O, Wang LS, Hsueh AJW. Protein Related to DAN and Cerberus Is a Bone Morphogenetic Protein Antagonist That Participates in Ovarian Paracrine Regulation. *J Biol Chem*. 2004;279:23134–23141.
256. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW. Primary Pulmonary Hypertension Is Associated With Reduced Pulmonary Vascular Expression of Type II Bone Morphogenetic Protein Receptor. *Circulation*. 2002;105:1672–1678.

257. McDonald J, Wooderchak-Donahue W, VanSant Webb C, Whitehead K, Stevenson DA, Bayrak-Toydemir P. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: genetics and molecular diagnostics in a new era. *Front Genet* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 8];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00001/abstract>
258. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Berg J, Manes A, McGaughran J, Pauciulo M, Wheeler L, Morrell NW. Clinical and Molecular Genetic Features of Pulmonary Hypertension in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001;345:325–334.
259. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109:1953–1961.
260. Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2009;46:331–337.
261. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, Palomero T, Sumazin P, Kim HR, Talati MH, West J, Loyd JE, Chung WK. Whole Exome Sequencing to Identify a Novel Gene (Caveolin-1) Associated With Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5:336–343.
262. Marsboom G, Chen Z, Yuan Y, Zhang Y, Tiruppathi C, Loyd JE, Austin ED, Machado RF, Minshall RD, Rehman J, Malik AB. Aberrant caveolin-1-mediated Smad signaling and proliferation identified by analysis of adenine 474 deletion mutation (c.474delA) in patient fibroblasts: a new perspective on the mechanism of pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell*. 2017;28:1177–1185.
263. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Trégouët D-A, Borczuk A, Rosenzweig EB, Girerd B, Montani D, Humbert M, Loyd JE, Kass RS, Chung WK. A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:351–361.
264. Bohnen MS, Roman-Campos D, Terrenoire C, Jnani J, Sampson KJ, Chung WK, Kass RS. The Impact of Heterozygous *KCNK3* Mutations Associated With Pulmonary Arterial Hypertension on Channel Function and Pharmacological Recovery. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2017 [cited 2021 Sep 20];6. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.117.006465>
265. Eyries M, Montani D, Girerd B, Favrolt N, Riou M, Faivre L, Manaud G, Perros F, Gräf S, Morrell NW, Humbert M, Soubrier F. Familial pulmonary arterial hypertension by *KDR* heterozygous loss of function. *Eur Respir J*. 2020;55:1902165.
266. Liao W, Feng L, Zheng J, Chen D. Deciphering Mechanisms Controlling Placental Artery Endothelial Cell Migration Stimulated by Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrinology*. 2010;151:3432–3444.

267. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mahon GM, Waltenberger J, Voelkel NF, Tudor RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001;15:427–438.
268. Gräf S, Haimel M, Bleda M, Hadinnapola C, Southgate L, Li W, Hodgson J, Liu B, Salmon RM, Southwood M, Machado RD, Martin JM, Treacy CM, Yates K, Daugherty LC, Shamardina O, Whitehorn D, Holden S, Aldred M, Bogaard HJ, Church C, Coghlan G, Condliffe R, Corris PA, Danesino C, Eyries M, Gall H, Ghio S, Ghofrani H-A, Gibbs JSR, Girerd B, Houweling AC, Howard L, Humbert M, Kiely DG, Kovacs G, MacKenzie Ross RV, Moledina S, Montani D, Newnham M, Olschewski A, Olschewski H, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Prokopenko I, Rhodes CJ, Scelsi L, Seeger W, Soubrier F, Stein DF, Suntharalingam J, Swietlik EM, Toshner MR, van Heel DA, Vonk Noordegraaf A, Waisfisz Q, Wharton J, Wort SJ, Ouwehand WH, Soranzo N, Lawrie A, Upton PD, Wilkins MR, Trembath RC, Morrell NW. Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*. 2018;9:1416.
269. Yun X, Jiang H, Lai N, Wang J, Shimoda LA. Aquaporin 1-mediated changes in pulmonary arterial smooth muscle cell migration and proliferation involve  $\beta$ -catenin. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313:L889–L898.
270. Gräf S, Haimel M, Bleda M, Hadinnapola C, Southgate L, Li W, Hodgson J, Liu B, Salmon RM, Southwood M, Machado RD, Martin JM, Treacy CM, Yates K, Daugherty LC, Shamardina O, Whitehorn D, Holden S, Aldred M, Bogaard HJ, Church C, Coghlan G, Condliffe R, Corris PA, Danesino C, Eyries M, Gall H, Ghio S, Ghofrani H-A, Gibbs JSR, Girerd B, Houweling AC, Howard L, Humbert M, Kiely DG, Kovacs G, MacKenzie Ross RV, Moledina S, Montani D, Newnham M, Olschewski A, Olschewski H, Peacock AJ, Pepke-Zaba J, Prokopenko I, Rhodes CJ, Scelsi L, Seeger W, Soubrier F, Stein DF, Suntharalingam J, Swietlik EM, Toshner MR, van Heel DA, Vonk Noordegraaf A, Waisfisz Q, Wharton J, Wort SJ, Ouwehand WH, Soranzo N, Lawrie A, Upton PD, Wilkins MR, Trembath RC, Morrell NW. Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*. 2018;9:1416.
271. Sinner D, Rankin S, Lee M, Zorn AM. Sox17 and  $\beta$ -catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes. *Development*. 2004;131:3069–3080.
272. Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature*. 2005;434:786–792.
273. Zhu N, Welch CL, Wang J, Allen PM, Gonzaga-Jauregui C, Ma L, King AK, Krishnan U, Rosenzweig EB, Ivy DD, Austin ED, Hamid R, Pauciulo MW, Lutz KA, Nichols WC, Reid JG, Overton JD, Baras A, Dewey FE, Shen Y, Chung WK. Rare variants in SOX17 are associated with pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. *Genome Med*. 2018;10:56.
274. Corada M, Orsenigo F, Morini MF, Pitulescu ME, Bhat G, Nyqvist D, Breviario F, Conti V, Briot A, Iruela-Arispe ML, Adams RH, Dejana E. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun*. 2013;4:2609.

275. Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EMHF, Roofthoofthoof MTR, Leter EM, Douwes JM, Van Dijk A, Vonk-Noordegraaf A, Dijk-Bos KK, Hoefsloot LH, Hoendermis ES, Gille JJP, Sikkema-Raddatz B, Hofstra RMW, Berger RMF. *TBX4* mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2013;50:500–506.
276. Zhu N, Gonzaga-Jauregui C, Welch CL, Ma L, Qi H, King AK, Krishnan U, Rosenzweig EB, Ivy DD, Austin ED, Hamid R, Nichols WC, Pauciulo MW, Lutz KA, Sawle A, Reid JG, Overton JD, Baras A, Dewey F, Shen Y, Chung WK. Exome Sequencing in Children With Pulmonary Arterial Hypertension Demonstrates Differences Compared With Adults. *Circ Genomic Precis Med* [Internet]. 2018 [cited 2021 Sep 20];11. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCGEN.117.001887>
277. Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EMHF, Roofthoofthoof MTR, Leter EM, Douwes JM, Van Dijk A, Vonk-Noordegraaf A, Dijk-Bos KK, Hoefsloot LH, Hoendermis ES, Gille JJP, Sikkema-Raddatz B, Hofstra RMW, Berger RMF. *TBX4* mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet*. 2013;50:500–506.
278. Glaser A, Arora R, Hoffmann S, Li L, Gretz N, Papaioannou VE, Rappold GA. *Tbx4* interacts with the short stature homeobox gene *Shox2* in limb development: *BX4* Activates *Shox2* in Limb development. *Dev Dyn*. 2014;243:629–639.
279. Southgate L, Machado RD, Gräf S, Morrell NW. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:85–95.
280. Bjornsson J, Edwards WD. Primary Pulmonary Hypertension: A Histopathologic Study of 80 Cases. *Mayo Clin Proc*. 1985;60:16–25.
281. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019;53:1801887.
282. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ*. 2018;j5492.
283. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, Kao PN. Simvastatin Attenuates Smooth Muscle Neointimal Proliferation and Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1403–1408.
284. Dewachter L, Adnot S, Fadel E, Humbert M, Maitre B, Barlier-Mur A-M, Simonneau G, Hamon M, Naeije R, Eddahibi S. Angiopoietin/Tie2 Pathway Influences Smooth Muscle Hyperplasia in Idiopathic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1025–1033.
285. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevielle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Contributes to Altered

- Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:311–322.
286. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Darteville P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. *Circulation*. 2006;113:1857–1864.
287. de Man FS, Tu L, Handoko ML, Rain S, Ruiters G, François C, Scholij I, Dorfmueller P, Simonneau G, Fadel E, Perros F, Boonstra A, Postmus PE, van der Velden J, Vonk-Noordegraaf A, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Dysregulated Renin–Angiotensin–Aldosterone System Contributes to Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:780–789.
288. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest*. 2009;119:512–523.
289. Ricard N, Tu L, Le Hiress M, Huertas A, Phan C, Thuillet R, Sattler C, Fadel E, Seferian A, Montani D, Dorfmueller P, Humbert M, Guignabert C. 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*. 2014;129:1586–1597.
290. Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girerd B, Perros F, Montani D, Fabre D, Fadel E, Eddahibi S, Cohen-Kaminsky S, Guignabert C, Humbert M. Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2012;40:895–904.
291. Bressollette E, Dupuis J, Bonan R, Doucet S, Cernacek P, Tardif J-C. Intravascular Ultrasound Assessment of Pulmonary Vascular Disease in Patients With Pulmonary Hypertension. *Chest*. 2001;120:809–815.
292. Ghosh S, Gupta M, Xu W, Mavrikis DA, Janocha AJ, Comhair SAA, Haque MM, Stuehr DJ, Yu J, Polgar P, Naga Prasad SV, Erzurum SC. Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthesis in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310:L1199–L1205.
293. Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1925–1932.
294. Masri FA, Xu W, Comhair SAA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, Drazba J, Anand-Apte B, Erzurum SC. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293:L548–L554.

295. Cool CD, Kennedy D, Voelkel NF, Tudor RM. Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol*. 1997;28:434–442.
296. Tudor RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, Yacoub M, Polak JM, Voelkel NF. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol*. 2001;195:367–374.
297. Asosingh K, Aldred MA, Vasanji A, Drazba J, Sharp J, Farver C, Comhair SAA, Xu W, Licina L, Huang L, Anand-Apte B, Yoder MC, Tudor RM, Erzurum SC. Circulating Angiogenic Precursors in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol*. 2008;172:615–627.
298. Ricard N, Tu L, Le Hiress M, Huertas A, Phan C, Thuillet R, Sattler C, Fadel E, Seferian A, Montani D, Dorfmüller P, Humbert M, Guignabert C. 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*. 2014;129:1586–1597.
299. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mahon GM, Waltenberger J, Voelkel NF, Tudor RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001;15:427–438.
300. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J*. 2005;19:1178–1180.
301. Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, Wick M, Nemenoff RA, Geraci MW, Voelkel NF. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) Expression Is Decreased in Pulmonary Hypertension and Affects Endothelial Cell Growth. *Circ Res*. 2003;92:1162–1169.
302. Jasmin J-F, Mercier I, Dupuis J, Tanowitz HB, Lisanti MP. Short-Term Administration of a Cell-Permeable Caveolin-1 Peptide Prevents the Development of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Hypertrophy. *Circulation*. 2006;114:912–920.
303. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. Nuclear Translocation of Phosphorylated STAT3 Is Essential for Vascular Endothelial Growth Factor-induced Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation. *J Biol Chem*. 2003;278:40026–40031.
304. Soon E, Crosby A, Southwood M, Yang P, Tajsic T, Toshner M, Appleby S, Shanahan CM, Bloch KD, Pepke-Zaba J, Upton P, Morrell NW. Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II Deficiency and Increased Inflammatory Cytokine Production. A Gateway to Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;192:859–872.

305. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevelle P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine Fibroblast Growth Factor-2 Signaling Contributes to Altered Endothelial Phenotype in Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45:311–322.
306. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Dartevelle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. *Circulation*. 2006;113:1857–1864.
307. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2015;131:1006–1018.
308. Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, Flores S. Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med*. 2007;28:23–42.
309. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G, Humbert M. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007;29:462–468.
310. Wang W, Yan H, Zhu W, Cui Y, Chen J, Wang X, Li S, Zhu J. Impairment of Monocyte-derived Dendritic Cells in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *J Clin Immunol*. 2009;29:705–713.
311. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dahal BK, Vater A, Klussmann S, Ghofrani HA, Weissmann N, Klepetko W, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Immune and Inflammatory Cell Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:897–908.
312. Žaloudíková M, Vytášek R, Vajnerová O, Hnilíčková O, Vízek M, Hampl V, Herget J. Depletion of Alveolar Macrophages Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension but not Hypoxia-Induced Increase in Serum Concentration of MCP-1. *Physiol Res*. 2016;763–768.
313. Rose F, Hattar K, Gakisich S, Grimminger F, Olschewski H, Seeger W, Tschuschner A, Schermuly R, Weissmann N, Hanze J, Sibelius U, Ghofrani H. Increased neutrophil mediator release in patients with pulmonary hypertension – suppression by inhaled iloprost. *Thromb Haemost*. 2003;90:1141–1149.
314. von Nussbaum F, Li VM, Meibom D, Anlauf S, Bechem M, Delbeck M, Gerisch M, Harrenga A, Karthaus D, Lang D, Lustig K, Mittendorf J, Schäfer M, Schäfer S, Schamberger J. Potent and Selective Human Neutrophil Elastase Inhibitors with Novel Equatorial Ring Topology: in vivo Efficacy of the Polar Pyrimidopyridazine BAY-8040 in a Pulmonary Arterial Hypertension Rat Model. *ChemMedChem*. 2016;11:199–206.

315. Aldabbous L, Abdul-Salam V, McKinnon T, Duluc L, Pepke-Zaba J, Southwood M, Ainscough AJ, Hadinnapola C, Wilkins MR, Toshner M, Wojciak-Stothard B. Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36:2078–2087.
316. Hu Y, Chi L, Kuebler WM, Goldenberg NM. Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells.* 2020;9:2338.
317. Perros F, Dorfmüller P, Montani D, Hammad H, Waelput W, Girerd B, Raymond N, Mercier O, Mussot S, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Lambrecht BN. Pulmonary Lymphoid Neogenesis in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:311–321.
318. Salojin KV, Le Tonquèze M, Nassovov EL, Blouch MT, Baranov AA, Saraux A, Guillevin L, Fiessinger JN, Piette JC, Youinou P. Anti-endothelial cell antibodies in patients with various forms of vasculitis. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14:163–169.
319. Colvin KL, Cripe PJ, Ivy DD, Stenmark KR, Yeager ME. Bronchus-associated Lymphoid Tissue in Pulmonary Hypertension Produces Pathologic Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188:1126–1136.
320. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:1628–1631.
321. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2010;122:920–927.
322. Perros F, Dorfmüller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Godot V, Capel F, Adnot S, Eddahibi S, Mazmanian M, Fadel E, Herve P, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007;29:937–943.
323. Dorfmüller P, Zarka V, Durand-Gasselin I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lherminé A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Chemokine RANTES in Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:534–539.
324. Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of Endothelium-derived CC Chemokine Ligand 2 in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:1041–1047.
325. Tamura Y, Phan C, Tu L, Le Hires M, Thuillet R, Jutant E-M, Fadel E, Savale L, Huertas A, Humbert M, Guignabert C. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2018;128:1956–1970.

326. Parpaleix A, Amsellem V, Houssaini A, Abid S, Breau M, Marcos E, Sawaki D, Delcroix M, Quarck R, Maillard A, Couillin I, Ryffel B, Adnot S. Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2016;48:470–483.
327. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, Khan RA, Bhat SY, Qureshi IA, Manavathi B, Khan AA, August A, Hasnain SE, Khan N. Amino acid starvation sensing dampens IL-1 $\beta$  production by activating riboclustering and autophagy. *PLoS Biol*. 2018;16:e2005317.
328. Montani D, Lau EM, Dorfmüller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
329. Mandel J, Mark EJ, Hales CA. Pulmonary Venocclusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1964–1973.
330. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais M-C, Dorfmüller 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. *Am J Pathol*. 2015;185:356–371.
331. Montani D, Lau EM, Descatha A, Jaïs X, Savale L, Andujar P, Bensefa-Colas L, Girerd B, Zendah I, Le Pavec J, Seferian A, Perros F, Dorfmüller P, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2015;46:1721–1731.
332. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, Chelghoum N, Coulet F, Bonnet D, Dorfmüller P, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Tregouët D-A, Humbert M, Soubrier F. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet*. 2013;46:65.
333. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattam KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR. The GCN2 eIF2 Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6681–6688.
334. Masson GR. Towards a model of GCN2 activation. *Biochem Soc Trans*. 2019;47:1481–1488.
335. Manaud G, Nossent EJ, Lambert M, Ghigna M-R, Boët A, Vinhas M-C, 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, Remy S, Anegon I, Bogaard HJ, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Grünberg K, Humbert M, Montani D, Dorfmüller P, Antigny F, Perros F. Comparison of Human and Experimental Pulmonary Venocclusive Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63:118–131.
336. Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract. *Biochem Soc Trans*. 2020;48:327–336.

337. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P. DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*. 2009;137:2179–2180.
338. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastri ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature*. 2018;560:494–498.
339. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol*. 2006;79:214–222.
340. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276:80–96.
341. Bae J, Lee SJ, Park C-G, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the Surface on Activated T Cells via Its Cytoplasmic Domain and Protein Kinase C Signaling. *J Immunol*. 2014;193:3101–3112.
342. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 Kinase GCN2 Is Essential for the Murine Immune System to Adapt to Amino Acid Deprivation by Asparaginase1–3. *J Nutr*. 2010;140:2020–2027.
343. Hope HC, Brownlie RJ, Fife CM, Steele L, Lorger M, Salmond RJ. Coordination of asparagine uptake and asparagine synthetase expression modulates CD8+ T cell activation. *JCI Insight*. 2021;6:e137761.
344. Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A. Halofuginone Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science*. 2009;324:1334–1338.
345. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Tsogka K, Sounidaki M, Stefanidis I. Differential effects of the two amino acid sensing systems, the GCN2 kinase and the mTOR complex 1, on primary human alloreactive CD4+ T-cells. *Int J Mol Med*. 2016;37:1412–1420.
346. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*. 2005;22:633–642.
347. Phillipson-Weiner L, Mirek ET, Wang Y, McAuliffe WG, Wek RC, Anthony TG. General control nonderepressible 2 deletion predisposes to asparaginase-associated pancreatitis in mice. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol*. 2016;310:G1061–G1070.
348. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti

- F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13:54–61.
349. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13:1050–1059.
350. Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, Koritzinsky M, Madaio MP, McGaha TL. The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:10774–10779.
351. Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ.* 2011;18:1316–1325.
352. Pruenster M, Kurz ARM, Chung K-J, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, Eggersmann TK, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, Sperandio M. Extracellular MRP8/14 is a regulator of  $\beta$ 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun.* 2015;6:6915.
353. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood.* 2004;104:4260–4268.
354. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J Immunol.* 2003;170:3233–3242.
355. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, Brissova M, Powers AC, Opdenakker G, Phillipson M. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood.* 2012;120:4653–4662.
356. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood.* 2008;112:1461–1471.
357. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, Luhmann UFO, Lange CAK, Zhai Z, Arthur HM, Bainbridge J, Moss SE, Greenwood J. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- $\beta$  signalling. *Nature.* 2013;499:306–311.

358. Singhal M, Gengenbacher N, Abdul Pari AA, Kamiyama M, Hai L, Kuhn BJ, Kallenberg DM, Kulkarni SR, Camilli C, Preuß SF, Leuchs B, Mogler C, Espinet E, Besemfelder E, Heide D, Heikenwalder M, Sprick MR, Trumpp A, Krijgsveld J, Schlesner M, Hu J, Moss SE, Greenwood J, Augustin HG. Temporal multi-omics identifies LRG1 as a vascular niche instructor of metastasis. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabe6805.
359. 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.
360. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1993;151:6338–6346.
361. Meizlish ML, Franklin RA, Zhou X, Medzhitov R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:557–581.
362. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol*. 2018;36:411–420.
363. Andrews TS, Hemberg M. M3Drop: dropout-based feature selection for scRNASeq. *Bioinforma Oxf Engl*. 2019;35:2865–2867.
364. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, Trapnell C. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods*. 2017;14:979–982.
365. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastri ME, Lönnberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature*. 2018;560:494–498.
366. Wang J, Vasaiak S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:W130–W137.
367. Nossent EJ, Antigny F, Montani D, Bogaard HJ, Ghigna MR, Lambert M, Thomas de Montpréville V, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Mercier O, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Humbert M, Perros F, Dorfmueller P. 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.
368. Best DH, Sumner KL, Austin ED, Chung WK, Brown LM, Borczuk AC, Rosenzweig EB, Bayrak-Toydemir P, Mao R, Cahill BC, Tazelaar HD, Leslie KO, Hemnes AR, Robbins IM, Elliott CG. EIF2AK4 Mutations in Pulmonary Capillary Hemangiomatosis. *Chest*. 2014;145:231–236.

369. Ardawi MSM, Newsholme EA. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochem J.* 1982;208:743–748.
370. Wu J, Li G, Li L, Li D, Dong Z, Jiang P. Asparagine enhances LCK signalling to potentiate CD8+ T-cell activation and anti-tumour responses. *Nat Cell Biol.* 2021;23:75–86.
371. Sundrud MS, Koralov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A. Halofuginone Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science.* 2009;324:1334–1338.
372. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccosanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007;13:54–61.
373. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13:1050–1059.
374. Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ.* 2011;18:1316–1325.
375. Pruenster M, Kurz ARM, Chung K-J, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, Eggersmann TK, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, Sperandio M. Extracellular MRP8/14 is a regulator of  $\beta 2$  integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun.* 2015;6:6915.
376. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood.* 2004;104:4260–4268.
377. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J Immunol.* 2003;170:3233–3242.
378. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1993;151:6338–6346.
379. Meizlish ML, Franklin RA, Zhou X, Medzhitov R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2021;39:557–581.

380. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, Brissova M, Powers AC, Opdenakker G, Phillipson M. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012;120:4653–4662.
381. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112:1461–1471.
382. Nureki S-I, Tomer Y, Venosa A, Katzen J, Russo SJ, Jamil S, Barrett M, Nguyen V, Kopp M, Mulugeta S, Beers MF. Expression of mutant Sftpc in murine alveolar epithelia drives spontaneous lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2018;128:4008–4024.
383. Wu B, Zhang L, Zhu Y-H, Zhang Y, Zheng F, Yang J-Y, Guo L-Y, Li X-Y, Wang L, Tang J-M, Chen S-Y, Wang J-N. Mesoderm/mesenchyme homeobox gene 1 promotes vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and vascular remodeling. *Int J Cardiol*. 2018;251:82–89.
384. Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, Péchoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay E, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmüller 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.
385. Hoffmann J, Marsh LM, Pieper M, Stacher E, Ghanim B, Kovacs G, König P, Wilkens H, Haitchi HM, Hoefler G, Klepetko W, Olschewski H, Olschewski A, Kwapiszewska G. Compartment-specific expression of collagens and their processing enzymes in intrapulmonary arteries of IPAH patients. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308:L1002–L1013.
386. Damico R, Kolb TM, Valera L, Wang L, Houston T, Tedford RJ, Kass DA, Rafaels N, Gao L, Barnes KC, Benza RL, Rand JL, Hamid R, Loyd JE, Robbins IM, Hemnes AR, Chung WK, Austin ED, Drummond MB, Mathai SC, Hassoun PM. Serum Endostatin Is a Genetically Determined Predictor of Survival in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191:208–218.
387. Bordenave J, Thuillet R, Tu L, Phan C, Cumont A, Marsol C, Huertas A, Savale L, Hibert M, Galzi J-L, Bonnet D, Humbert M, Frossard N, Guignabert C. Neutralization of CXCL12 attenuates established pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res*. 2020;116:686–697.
388. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10:165–177.
389. Kugathasan L, Ray JB, Deng Y, Rezaei E, Dumont DJ, Stewart DJ. The angiopoietin-1–Tie2 pathway prevents rather than promotes pulmonary arterial hypertension in transgenic mice. *J Exp Med*. 2009;206:2221–2234.

390. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328:1732–1739.
391. Bennett RT. Vasoconstrictive effects of endothelin-1, endothelin-3, and urotensin II in isolated perfused human lungs and isolated human pulmonary arteries. *Thorax*. 2004;59:401–407.
392. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An Abnormal Mitochondrial–Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ –Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats: Similarities to Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2006;113:2630–2641.
393. Fijalkowska I, Xu W, Comhair SAA, Janocha AJ, Mavrakis LA, Krishnamachary B, Zhen L, Mao T, Richter A, Erzurum SC, Tudor RM. Hypoxia Inducible-Factor1 $\alpha$  Regulates the Metabolic Shift of Pulmonary Hypertensive Endothelial Cells. *Am J Pathol*. 2010;176:1130–1138.
394. Neubert L, Borchert P, Stark H, Hofer A, Vogel-Claussen J, Warnecke G, Eubel H, Kuenzler P, Kreipe H-H, Hoepfer MM, Kuehnel M, Jonigk D. Molecular Profiling of Vascular Remodeling in Chronic Pulmonary Disease. *Am J Pathol*. 2020;190:1382–1396.
395. Thenappan T, Chan SY, Weir EK. Role of extracellular matrix in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2018;315:H1322–H1331.
396. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E. Targeted Disruption of the Matrix Metalloproteinase-9 Gene Impairs Smooth Muscle Cell Migration and Geometrical Arterial Remodeling. *Circ Res*. 2002;91:852–859.
397. Pullamsetti S, Krick S, Yilmaz H, Ghofrani AH, Schudt C, Weissmann N, Fuchs B, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Inhaled tolfenetrine reverses pulmonary vascular remodeling via inhibition of smooth muscle cell migration. *Respir Res*. 2005;6:128.
398. Li-Saw-Hee FL, Edmunds E, Blann AD, Beevers DG, Lip GYH. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor metalloproteinase-1 levels in essential hypertension. *Int J Cardiol*. 2000;75:43–47.
399. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2015;131:1006–1018.
400. Stenmark KR, Frid M, Perros F. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: An Evolving Paradigm and a Promising Therapeutic Target in PAH. *Circulation*. 2016;133:1734–1737.
401. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum

- concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1628–1631.
402. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 1998;11:554–559.
403. Fartoukh M, Emilie D, Gall CL, Monti G, Simonneau G, Humbert M. Chemokine Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$  mRNA Expression in Lung Biopsy Specimens of Primary Pulmonary Hypertension. *Chest*. 1998;114:50S-51S.
404. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre J-S, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israel-Biet D. Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2010;36:1284–1293.
405. Parpaleix A, Amsellem V, Houssaini A, Abid S, Breau M, Marcos E, Sawaki D, Delcroix M, Quarck R, Maillard A, Couillin I, Ryffel B, Adnot S. Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2016;48:470–483.
406. Price LC, Wort SJ, Perros F, Dorfmueller P, Huertas A, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest*. 2012;141:210–221.