Rôle des canaux potassiques KCNK3/TASK-1 et KATP dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire

Hélène Le Ribeuz

▶ **To cite this version:**

Hélène Le Ribeuz. Rôle des canaux potassiques KCNK3/TASK-1 et KATP dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ022 . tel-03702650

HAL Id: tel-03702650
https://theses.hal.science/tel-03702650

Submitted on 23 Jun 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

NNT : 2022UPASQ022

Rôle des canaux potassiques KCNK3/TASK-1 et KATP dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire

Role of potassium channels KCNK3/TASK-1 and KATP in the pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 569, Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : physiologie, physiopathologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de pharmacie

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et nouvelles thérapies (Université Paris-Saclay, Inserm)**, sous la direction de **Fabrice ANTIGNY**, Chargé de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 24 Mai 2022, par

Hélène LE RIBEUZ

Composition du Jury

Marc HUMBERT Professeur, PU-PH INSERM UMRS_999 Université Paris Saclay	Président
Christophe VANDIER Professeur, INSERM UMRS_1069 Université de Tours	Rapporteur & Examinateur
Michel VIVAUDOU Directeur de recherche, CEA/CNRS UMRS_5075 Université Grenoble-Alpes	Rapporteur & Examinateur
Jean-François FAIVRE Professeur, Laboratoire PRéTI, UR 24184 Université de Poitiers	Examinateur
Sophie NADAUD Chargée de recherche, INSERM UMRS_1166 Sorbonne Université	Examinatrice
Fabrice ANTIGNY Chargé de recherche, INSERM UMRS_999 Université Paris Saclay	Directeur de thèse

Table des matières

Table des matières **0**

Remecriements **5**

Liste des Figures **8**

Liste des tableaux **9**

Liste des travaux de thèse **10**

Liste des travaux hors thèse **11**

Liste des abréviations : **12**

Introduction **1**

1. Physiologie pulmonaire et cardiaque 1

1.1. Physiologie pulmonaire 1

1.2. Physiologie cardiaque et circulatoire 2

1.2.1. Le cœur 2

1.2.2. La circulation sanguine 2

1.2.2.1. La circulation systémique 3

1.2.2.2. La circulation pulmonaire 3

1.3. Physiologie artérielle 4

2. Hypertension pulmonaire et hypertension artérielle pulmonaire 4

2.1. Définition 4

2.2. Classification des HTP 5

2.2.1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) 5

2.2.2. Hypertension pulmonaire secondaire à une défaillance cardiaque gauche 5

2.2.3. Hypertension pulmonaire due à des maladies respiratoires et/ou à une hypoxie 6

2.2.4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique 6

2.2.5. HTP d'étiologies indéfinies ou multifactorielles 6

2.3. Définition de l'HTAP 6

2.4. Classification de l'HTAP 7

2.4.1. HTAP idiopathique (HTAPi) 7

2.4.2. HTAP héritable (HTAPh) 7

2.4.3. HTAP induite par des médicaments ou des toxiques 7

2.4.4. HTAP associée à une pathologie sous-jacente 8

2.4.5. HTAP avec réponse aux inhibiteurs de canaux calciques 8

2.4.6. HTAP avec une atteinte veineuse pulmonaire : maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) ou hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP) 8

2.4.7. HTAP persistante du nouveau-né 9
2.5. Épidémiologie de L'HTAP 9
2.6. Diagnostic 10
3. Les canaux ioniques dans la circulation pulmonaire 11
3.1. Rôle des canaux ioniques sur le tonus vasculaire 11
3.2. Définition et classification des canaux ioniques 14
3.2.1. Les canaux potassiques 14
3.2.1.1. Les canaux potassiques à rectification entrante (K_{ir}) 14
3.2.1.2. Les canaux potassiques ATP-dépendant (KATP) 15
3.2.1.3. Les canaux potassiques voltage dépendants (K_v 20
3.2.1.4. Les canaux potassiques calcium dépendant (K_{Ca}) 21
3.2.1.5. Les canaux potassiques à deux domaines pores (K_{2P}) 24
3.2.2. Les canaux calciques 28
3.2.3. Les canaux chlore 29
4. Génétique de l'HTAP 32
4.1. Tableau récapitulatif des mutations 32
4.2. Mutations des canaux potassiques 33
4.2.1. KCNA5 33
4.2.2. KCNK3 34
4.2.3. ABCC8 37
4.2.4. ABCC9 41
4.3. Nouvelles mutations 42
5. Physiopathologie de l'HTAP 43
5.1. Histopathologie des lésions vasculaires 43
5.1.1. Lésions de l'intima 43
5.1.2. Hypertrophie de la media 44
5.1.3. Lésions pléxiformes 44
5.2. Dérégulations cellulaires 45
5.2.1. Dysfonction endothéliale 45
5.2.2. Dysfonction des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CML-APs) 46
5.2.3. Dysfonction des fibroblastes 48
5.2.4. Dysfonction d'autres types cellulaires 49
5.2.4.1. Les péricytes 49
5.2.4.2. Cellules endothéliales progénitrices (EPC) 49
5.2.4.3. Cellules progénitrices des cellules musculaires lisses (SPF) 50
5.3. Altération des mécanismes cellulaires 50
5.3.1. Altération de la balance prolifération/apoptose 50

5.3.1.1. Facteurs de croissance 50
5.3.1.2. La sérotonine 53
5.4. Altération du tonus vasculaire pulmonaire 54
5.4.1. Facteurs vasoconstricteurs 54
5.4.1.1. Endotheline-1 (ET-1) 54
5.4.1.2. Thromboxane A2 55
5.4.2. Facteurs vasodilatateurs 56
5.4.2.1. La voie du monoxyde d'azote (NO) 56
5.4.2.2. La voie de la prostacycline 57
5.5. Inflammation et HTAP 58
5.6. Micro ARN et HTAP 59
5.6.1. miR 204 62
5.6.2. miR 138 62
5.6.3. miR-1 63
5.7. Implication des canaux K^+ dans la physiopathologie de l'HTAP 63
5.7.1. Canaux Kv 63
5.7.2. Canaux KATP 65
5.7.3. Canaux K2P 66
5.7.4. Canaux K_{Ca} 67
6. Les traitements de l'HTAP 68
6.1. La voie de la prostacycline 69
6.2. La voie de l'endotheline 71
6.3. La voie du monoxyde d'azote 71
6.3.1. Les inhibiteurs des PDE5 71
6.3.2. Les activateurs de la guanylate cyclase soluble (sGC) 72
6.4. Les bloqueurs de canaux calciques 72
6.5. Molécules en cours d'essais cliniques 72
6.6. Les thérapies géniques 74
6.6.1. Kv1.5 75
6.6.2. HIF1-α 75
6.7. Molécules ciblant les canaux potassiques 76
7. Les modèles animaux d'HTAP 77
7.1. Modèle monocrotaline (MCT) 77
7.2. Modèle d'Hypoxie chronique chez le rat ou la souris 77
7.3. Modèle d'hypoxie chronique + injection de sugen 78
7.4. Modèle de cerclage de l'artère pulmonaire 78
7.5. Modèle de pneumectomie associé à la MCT ou au sugen 79

Matériel et méthode 80
1. Modèles animaux utilisés 80
2. Échocardiographie 81
3. Mesures hémodynamiques 82
4. Prélèvement des organes 83
5. Myographe 84
6. Histologie 85
6.1. Coloration Hématoxylin-Eosine-Safran (HES) 85
6.2. Coloration rouge Sirius 86
7. Immunomarquages 86
7.1. Immunomarquage fluorescent 86
7.1.1. Marquage VWF/α-SMA 86
7.1.2. Marquage EDU 87
8. Culture cellulaire 87
8.1. Mise en culture de CML-AP humaine 87
8.2. Mise en culture de CE-AP humaine 87
8.3. Transfection des CML-APs et des CE-APs 88
8.4. Tests de prolifération des CML-APs et des CE-APs 88
8.5. Test de migration des CML-APs et des CE-APs 89
8.6. Mesure du potentiel de membrane des mitochondries par la sonde TMRE 89
9. Biologie Moléculaire 90
9.1. Expression protéique 90
9.1.1. Extraction protéique 90
9.1.2. Western blot 90
9.2. Expression génique 91
9.2.1. Extraction des ARNs 91
9.2.2. Transcriptase inverse des ARNs 92
9.2.3. RT-qPCR 92
Exposé des travaux 94
PROJET 1: Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in pulmonary Vascular Cells 94
1. Rationnel 94
2. Objectif de l'étude 95
3. Méthodes 95
4. Résultats 96
5. Discussion 97
6. Conclusions 99

PROJET 2: SUR1 as a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension 121
1. Rationnel 121
2. Objectif de l'étude 122
3. Méthodes 122
4. Résultats 123
5. Discussion 124
6. Conclusions 126
PROJET 3: Involvement of SUR2/Kir6.1 in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension 166
1. Rationnel 166
2. Objectif de l'étude 166
1. Méthodes 167
2. Résultats 167
3. Discussion 169
4. Conclusion 171
Conclusion générale 210
Perspectives 213
Références bibliographiques 216

Remecriements

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de thèse, le Dr Fabrice Antigny pour ces 3 années et demi passées à ses cotés. Je te remercie pour ton implication de tous les jours dans mes travaux de thèse, pour répondre aux questions, pour réfléchir aux manips...même pendant que tu cours ! Merci de m'avoir impliqué dans de nombreux projets intéressants. Ma thèse a été en grande partie grâce à toi une super expérience qui m'a permis d'apprendre tellement de techniques, de connaissances...merci pour tout et merci de m'avoir fait confiance !

Je remercie le Pr Marc Humbert pour l'honneur qu'il me fait de présider mon jury de thèse. Je remercie le Pr Christophe Vandier et le Dr Michel Vivaudou pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie les examinateurs de ce travail, le Pr Jean François Faivre et le Dr Sophie Nadaud. Merci à vous tous de prendre de votre temps pour examiner mon travail.

Un grand merci à Mélanie Lambert et Grégoire Manaud mes acolytes de thèse pendant les deux premières années ! Vous avez su m'accueillir chaleureusement dès le début de ma thèse et d'apporter une bonne ambiance quotidienne à notre bureau couloir (un peu trop des fois il parait ?)

Mélanie merci de m'avoir tout appris des manips, grande prêtresse du western blot et du myographe et de m'avoir expliqué comment fonctionne Chef (surtout pour le coté artistique...). Je te souhaite pleins de réussite au Canada et j'espère venir te voir un de ces 4 !

Merci Grégoire, de m'avoir ouverte à une culture musicale différente (c'est un échec mais bon), pour tous ces débats géographiques sur la position exacte d'Angoulême, DANS LE CENTRE OUEST bien sur, de m'avoir souvent servi de chauffeur Uber première classe avec option odeur de clope et d'avoir tenu malgré des moments pas faciles ou ton humeur pouvait être assez massacrante ! j'espère t'avoir donné un peu le sourire et pu faire passer le temps un peu plus facilement ! Bon courage pout ton post-doc en chine ! euh non pardon

aux Etats Unis ;) On se revoie tantôt ! mais compte pas trop sur moi pour me perdre à Oklahoma city ahah

Merci au petiot Bastien Masson, Monsieur le Professeur ! C'était cool de passer ma fin de thèse avec un bizut comme toi :) Prends pas trop la confiance à dire que t'es le chef du bureau quand même ! Bon courage pour ta fin de thèse, je ne me fais pas de soucis pour toi mais va falloir s'améliorer pour les couleurs du myographe c'est très important !

Merci à Lucille, mon bizut du myographe, et à Firmin et Baghat pour leur bonne humeur, bon courage pour vos thèses !

Merci au P.O d'exister, on en aura passé des soirées autour d'une ou deux bières :)

Merci au Dr Véronique Capuano pour toutes nos discussions scientifiques et non scientifiques, c'était un plaisir de travailler à tes cotés, et d'envahir ton territoire avec une toute petite machine :) Merci à Yann Ruchon pour sa bonne humeur et son expertise pour les stats et autres problèmes informatiques.

Merci à Yvonne Dutheil pour sa bonne humeur quotidienne malgré nos erreurs de commande régulières.

Merci à tous les membres de l'équipe 2 de l'U999, merci au Dr Fréderic Perros, de m'avoir accueilli dans l'équipe. Merci à Mary et Audrey pour votre soutien technique et votre sympathie. Merci a Florence et Lilia pour votre bonne humeur et votre gentillesse.
Merci à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire et que j'ai pu encadrer et qui ont pu m'aider dans l'avancée de cette thèse : Léa, Raja, Aurélien, Loan, Anaïs, Antoine...

Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi et d'être là pour moi au quotidien, je vous aime tout simplement. Bisous à mes grands parents qui ne comprennent pas vraiment pourquoi je suis toujours étudiante à 27 ans (moi non plus).
Merci à toute la famille Roustit pour leur présence et leur amitié depuis toujours,
Merci à toute ma famille de Paris et d'Auvergne pour leur soutient et leur amour.

Merci à mes meilleurs amis depuis plus de 10 ans maintenant...Mélanie, Emilie, Ania, Léa, Pierrick, Kévin, Matthieu. A toutes nos sorties, soirées, vacances et j'en passe. Je me sens chanceuse de vous avoir dans ma vie.

Enfin merci à Alexis, de me supporter depuis 6 ans, pour tous ces moments partagés, pour ton soutien et ton amour sans faille dans les bons et moins bons moments...tu sais déjà tout, merci d'être toi. J'embrasse mon Loukoum et le remercie de ses câlins poilus :)

Liste des Figures

Figure 1 Anatomie pulmonaire 1
Figure 2 Échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires 1
Figure 3 La circulation sanguine humaine 3
Figure 4 Composition de la paroi artérielle 4
Figure 5 Dernière classification des groupes d'HTP (Simmoneau et al, 2019) 5
Figure 6 Tableau des drogues et toxines connues pour induire une HTAP (Weathrald et al 2017) 7
Figure 7 Gradients chimiques et électriques des principaux ions dans les cellules musculaires lisses humaines (Adapté de lambert et al. 2018) 11
Figure 8 Implication des canaux K^+ et Ca^{2+} dans la relaxation des artères pulmonaire 12
Figure 9 Implication des canaux K^+ et Ca^{2+} dans la contraction des artères pulmonaires 12
Figure 10 Schéma représentatif de la voie de signalisation dépendant du calcium qui entraine la contraction des CML-APs 13
Figure 11 Schéma d'un canal Kir 14
Figure 12 Pourcentage d'homologie entre les trois SURs qui composent les canaux KATP (Moreau et al 2005) 16
Figure 13 Schéma d'un canal KATP 17
Figure 14 Schéma d'un canal Kv 20
Figure 15 Structure d'un canal BK_{CA} 22
Figure 16 Schéma d'un canal K2P 24
Figure 17 Liste des canaux K2P et de leurs propriétés physico-chimiques 25
Figure 18 Voies de régulation de KCNK3/TASK-1 (Olschewski et al, 2017) 27
Figure 19 Schéma des familles de canaux calciques (Lambert et al. 2018) 29
Figure 20 Schéma de la structure du canal CFTR 30
Figure 21 Voie de signalisation de BMPR2 et de ses gènes retrouvés mutés chez de patients HTAP d'après Morrell 2019 33
Figure 22 Schéma représentatif de la localisation des mutations sur la protéine KCNK3/TASK-1 35
Figure 23 Schéma représentatif de la localisation des mutations sur la protéine SUR1 38
Figure 24 Schéma représentant l'hypothèse des mécanismes à l'origine de l'HTP survenu dans le syndrome de Cantu (McClenaghan et al. 2019) 41
Figure 25 Coloration HES d'une lésion intimale d'une artériole pulmonaire 43
Figure 26 Coloration HES montrant l'hypertrophie de la média 44
Figure 27 Coloration HES d'une lésion plexiforme 44
Figure 28 Mécanismes impliqués dans la transition endothelio-mesenchymateuse (D'après Stenmark et al, 2016) 46
Figure 29 Mécanismes impliqués dans la régulation des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires au cours de l'HTAP (D'après Tajsic et al 2011) 48
Figure 30 Schéma représentant le déséquilibre de la voie du TGF-β dans l'HTAP (de Tielemans 2019) 53
Figure 31 Schéma représentant la synthèse du thromboxane A2 et de la prostacycline 55
Figure 32 Schéma représentant les différents acteurs impliqués dans la réponse inflammatoire dans l'HTAP (Hu et al. 2020) 59
Figure 33 Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la régulation des canaux K^+ dans les CML-APs dans le contexte de l'HTAP (Le Ribeuz et al. 2020) 68
Figure 34 Schéma représentatif des principales voies ciblées par les traitements actuels de l'HTAP 69
Figure 35 Représentation des différentes thérapies géniques expérimentées dans les modèles animaux d'HTP (Rai et al. 2021) 76
Figure 36 Schéma des différents modèles animaux utilisés au cours de ma thèse 81

Figure 37 Images d'un myographe EMKA technologies et zoom sur les mâchoires ou les vaisseaux sont positionnés 84
Figure 38 Schéma d'un EMKA bath en configuration organes isolés 84
Figure 39 Schéma représentatif du test de prolifération cellulaire par incorporation de BrdU 89
Figure 40 Schéma représentatif du test de migration par wound healing assay avec des inserts IBIDI© ... 89
Figure 41 Schéma représentant la technique de western blot 91
Figure 42 Schéma représentatif des étapes de la qPCR avec la technique Taqman 93
Figure 43 Schéma récapitulatif du rôle de SUR1 dans la physiopathologie de l'HTAP 211

Liste des tableaux

Tableau 1 Spécificité des différents inhibiteurs et activateurs des KATP 18
Tableau 2 Liste des gènes mutés connus dans l'HTAP 32
Tableau 3 Tableau des mutations du gène *KCNK3* retrouvées chez des patients HTAP 36
Tableau 4 Tableau des mutations dans le gène *ABCC8* retrouvées chez des patients HTAP 40
Tableau 5 Tableau récapitulatif de tous les miR étant impliqués dans l'HTAP 61

Liste des travaux de thèse

REVUE 1: Implication of potassium channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension.

Auteurs : **Le Ribeuz H**, Capuano V, Girerd B, Humbert N, Montani D, Antigny F

État : Accepté à Biomolecules en 2020

REVUE 2: Role of ion channel remodeling in endothelial dysfunction induced by pulmonary arterial hypertension

Auteurs : Gomes J, **Le Ribeuz H**, Antigny F, Adao R, Bras-Silva C

État : Accepté à Biomolecules en 2022

PROJET 1: Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells

Auteurs : Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Lambert M, Dutheil M, Mercier O, Humbert M, Montani D, Capuano V, Antigny F

État : Accepté International Journal of molecular science en 2020

PROJET 2: SUR1 as a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension

Auteurs: Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Dutheil M, Gooroochurn H, Boët A, Ghigna M-R, De Montpreville V, Girerd B, Lambert M, Mercier O, Chung W-K, Humbert M, Montani D, Antigny F

Etat: Accepté à American Journal of Respiratory cell and molecular biology en 2021

PROJET 3: Involvement of SUR2/Kir6.1 in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension

Auteurs : Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Dutheil M, Boët A, De Montpreville V, Mercier O, Humbert M, Montani D, Antigny F

Etat: En préparation

Liste des travaux hors thèse

PROJET 1: *In vivo* miR-138-5p inhibition alleviates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and normalizes pulmonary KCNK3 and SLC45A3 expression.

Auteurs: Le Ribeuz H, Courboulin A, Ghigna M-R, Lambert M, Hautefort M, Humbert M, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Perros F, Antigny F

État: Accepté à Respiratory Research en 2020

PROJET 2: Kcnk3 dysfunction exaggerates the development of pulmonary hypertension induced by left ventricular pressure overload.

Auteurs: Lambert M, Mendes-Ferreira P, Ghigna M-R, **Le Ribeuz H**, Adao R, Boët A, Capuano V, Rucker-Martin C, Bras-Silva C, Quarck R, Domergue V, Vachiery JL, Humbert M, Perros F, Montani D, Antigny F

État : Accepté à Cardiovascular Resaerch en 2021

PROJET 3: Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension

Auteurs: Le Ribeuz H, To L, Ghigna M-R, Martin C, Nagaraj C, Dreano E, Rucker-Martin C, Gierd B, Bouligand J, Pechoux C, Lambert M, Boët A, Issard J, Mercier O, Hoetzenecker K, Manoury B, Bequ F, Burgel PR, Cottart CH, Olschewski A, Sermet-Gaudelus I, Perros F, Humbert M, Montani D, Antigny F

État : Accepté à l'European Respiratory Journal en 2021

Liste des abréviations :

ABCC8: ATP Binding Cassette Channel member 8

ABCC9: ATP Binding Cassette Channel member 9

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adenosine diphosphate

AMP : Adenosine monophosphate

AMPc : Adenosine monophosphate cyclique

AP : Artère Pulmonaire

ARE : Antagoniste des récepteurs à l'endothéline

ATP : adénosine triphosphate

AINS : Anti Inflammatoire Non Stéroïdien

BMPR2: Bone Morphogenic Protein Receptor type II

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

Ca^{2+} : ion calcium

CAM : Calmoduline

CCVD : Canaux calciques voltage dépendant

CE : cellule endothéliale

CE-APs : Cellule endothéliale de l'artère pulmonaire

CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Cl^- : Chlore

CH : Hypoxie chronique

CML : cellule musculaire lisse

CML-APs : Cellule musculaire lisse de l'artère pulmonaire

CO_2 : dioxyde de carbone

CTEPH : HTP thromboembolique chronique

DAG : Di-Acyl-Glycérol

DC : Débit Cardiaque

DLCO : Capacité de diffusion du monoxyde de carbone

eNOS : Endotheliale nitric oxyde synthase

ET-1 : Endothéline de type 1

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GTP : Guanosine Triphosphate

HIF1-α : hypoxia inducible factor 1α

HTP : Hypertension pulmonaire

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

HTAPi : Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique

K^+: ion potassium

K2P : Canaux K+ a deux domaines pores

KATP : Canaux K+ ATP-dépendent

KCNK3: Potassium Channel Subfamily M member 3

IL6: Interleukine 6

mmHg : millimètre de mercure

MCT : monocrotaline

Mg^{2+} : ion magnésium

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MVOP : Maladie Veino-Occlusive Pulmonaire

NO : Nitric Oxyde (Monoxyde d'azote)

NBD : Nucleotide binding domain

O_2 : dioxygène

OD : oreillette droite

OG : oreillette gauche

PAPm : pression de l'artère pulmonaire moyenne

PCP : Pression Capillaire Pulmonaire

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGF: Platelet-derived growth factor

PIP2: phosphatidyl inositol bi-phosphate

PKA : Proteine Kinase activée par l'AMPc

PKG : Protéine kinase activée par le GMPc

PLC : phospholipase C

RE : Réticulum endoplasmique

RVP : Résistance Vasculaire Pulmonaire

sGC: Guanylate cyclase soluble

SUR: Sulfonylurea receptor

SNP: Single Nucléotide Polymorphism

TGF-β: Transforming Growth factor β

VD : ventricule droit

VG : ventricule gauche

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

1. Physiologie pulmonaire et cardiaque

1.1. Physiologie pulmonaire

Le poumon est composé de deux parties, le poumon droit qui comporte trois lobes et le poumon gauche qui comporte deux lobes. Le poumon est entouré d'une couche protectrice appelée plèvre. Sous les poumons se trouve le diaphragme, muscle qui délimite la cavité thoracique de l'abdomen et joue un rôle important dans la ventilation pulmonaire (figure 1).

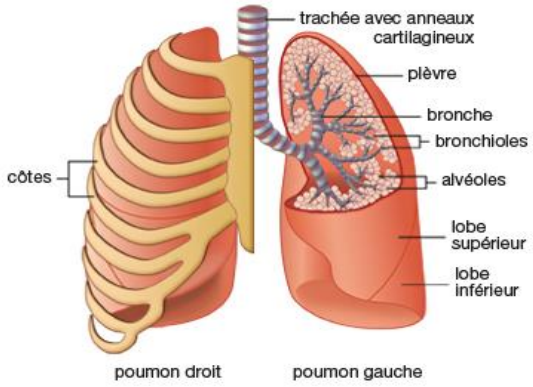


Figure 1 Anatomie pulmonaire

Le poumon a pour rôle essentiel de permettre l'entrée d'oxygène (O2) indispensable au métabolisme cellulaire et la sortie de dioxyde de carbone (CO2) principal déchet de nos cellules. L'O2 va circuler dans tout l'arbre bronchique, qui va de la trachée aux bronchioles où vont se situer les alvéoles pulmonaires, lieu de l'échange gazeux. On dénombre environ 150 millions d'alvéoles dans nos poumons ce qui permet d'avoir une surface d'échange optimale entre ces alvéoles très fines (<0,2µm) et les capillaires pulmonaires.

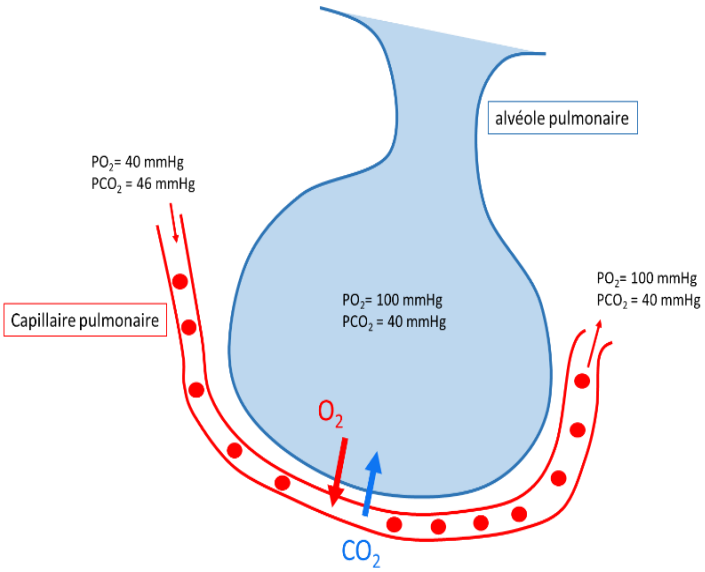


Figure 2 Échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires

C’est au niveau de cette membrane alveolo-capillaire que le CO2 et l’O2 diffusent selon leur gradient de pression (figure 2).

Le poumon a également un rôle de protection et de barrière contre toutes les toxines ou bactéries présentent dans l’air grâce au mucus produit dans les bronches.

1.2. Physiologie cardiaque et circulatoire

1.2.1. Le cœur

Le cœur est un organe qui permet de pomper le sang dans tout l’organisme. C’est un muscle creux constitué de deux cavités majeures qui sont séparées par le septum : le cœur gauche constitué de l’oreillette gauche et du ventricule gauche (VG) et le cœur droit avec l’oreillette droite et le ventricule droit (VD). Le cœur est entouré d’une membrane, le péricarde puis est constitué de trois feuillets principaux qui sont :

- L’épicarde qui est le tissu le plus externe et joue un rôle de revêtement et de protection,
- Le myocarde qui représente le tissu contractile et est constitué du muscle cardiaque composé par les cardiomyocytes,
- L’endocarde qui est la couche la plus interne, celle en contact avec le sang, elle est constituée d’une fine couche de cellules endothéliales.

1.2.2. La circulation sanguine

La circulation sanguine se décompose en deux parties, la circulation systémique et la circulation pulmonaire.

1.2.2.1. La circulation systémique

Elle est aussi appelée « grande circulation ». Son rôle est d'amener le sang riche en 02 du cœur vers les organes en passant par l'aorte à haute pression (130 mmHg) puis les autres artères, artérioles et enfin les capillaires ou la pression est bien plus faible (35 mmHg) et où l'échange en gaz et nutriments peut se faire de manière optimale (figure 3). Le sang en sortie de capillaire, pauvre en O2 va alors passer par les veinules puis les veines qui sont à basse pression (6-12 mmHg) jusqu'à arriver aux veines caves et l'entrée dans l'oreillette droite du cœur.

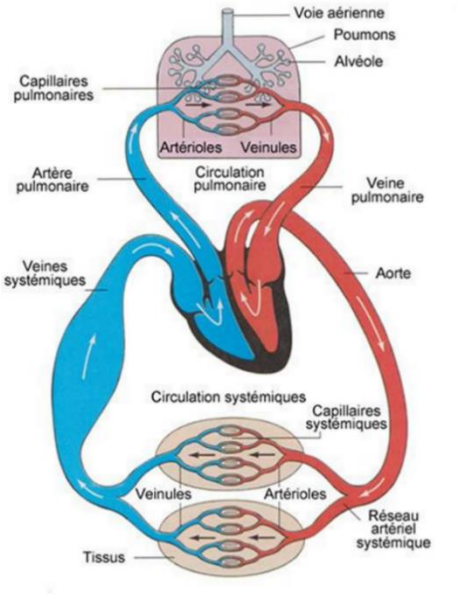


Figure 3 La circulation sanguine humaine

1.2.2.2. La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire qui est aussi appelée « petite circulation » va s'initier à la sortie du VD du cœur ou le sang pauvre en O2 va passer par l'artère pulmonaire (AP). La pression y est faible, entre 10 et 15 mmHg, le sang passe ensuite au niveau des artérioles pour finir au niveau des capillaires pulmonaires, lieu de l'échange gazeux avec les alvéoles pulmonaires. Le sang, riche en O2 va ensuite passer dans les veinules puis les veines pulmonaires pour se retrouver dans l'oreillette gauche du cœur.

1.3. Physiologie artérielle

Les APs sont composées de trois feuillets (figure 4). Le plus interne est l'intima, elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui joue le rôle de barrière étanche entre le sang et l'artère, et participe au maintien de l'hémostase du sang et au tonus vasculaire en secrétant des agents antiagrégants et des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. La couche intermédiaire des artères est la media, qui est délimitée de part et d'autre par une limitante élastique interne et externe. La media est constituée en majorité par les cellules musculaires lisses (CML), lui permettant sa fonction contractile. Elles sont organisées de façon concentrique et en plusieurs couches pour permettre à l'artère de modifier la taille de sa lumière en se contractant et se dilatant, ce qui entraine des modifications de la pression sanguine. La couche la plus externe est l'adventice. Elle est essentiellement constituée de tissu conjonctif riche en collagène, fibres élastiques et fibroblastes. Les vaisseaux de plus gros calibre ont une adventice vascularisée pour alimenter les artères en sang riche en O2, c'est le *vasa vasorum.*

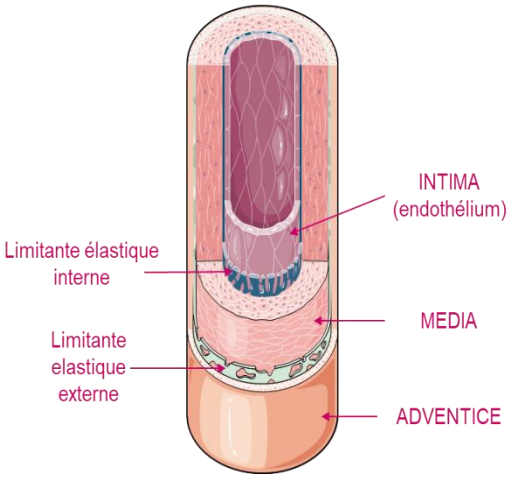


Figure 4 Composition de la paroi artérielle

2. Hypertension pulmonaire et hypertension artérielle pulmonaire

2.1. Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie grave qui a été définie pour la première fois en 1973 au 1er symposium sur l'HTP par une augmentation de la pression de l'artère pulmonaire moyenne (PAPm) superieur à 25 mmHg au repos. En condition non pathologique la PAPm est de 14.0±0.3 mmHg en moyenne. Le 6éme symposium sur l'HTP en 2018 a proposé de modifier le seuil limite d'inclusion à une PAPm de 20mmHg en association à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) au-delà de 3 unités de Wood (1 Wood = 80 dynes.s.cm^{-5}) (Simonneau et al. 2019).

Les RVP sont calculés par la formule : (PAPm – Pression capillaire pulmonaire (PCP))/Débit cardiaque (DC).

2.2. Classification des HTP

Il existe 5 grands groupes d'HTP :

1 PAH
- 1.1 Idiopathic PAH
- 1.2 Heritable PAH
- 1.3 Drug- and toxin-induced PAH (table 3)
- 1.4 PAH associated with:
  - 1.4.1 Connective tissue disease
  - 1.4.2 HIV infection
  - 1.4.3 Portal hypertension
  - 1.4.4 Congenital heart disease
  - 1.4.5 Schistosomiasis
- 1.5 PAH long-term responders to calcium channel blockers (table 4)
- 1.6 PAH with overt features of venous/capillaries (PVOD/PCH) involvement (table 5)
- 1.7 Persistent PH of the newborn syndrome

2 PH due to left heart disease
- 2.1 PH due to heart failure with preserved LVEF
- 2.2 PH due to heart failure with reduced LVEF
- 2.3 Valvular heart disease
- 2.4 Congenital/acquired cardiovascular conditions leading to post-capillary PH

3 PH due to lung diseases and/or hypoxia
- 3.1 Obstructive lung disease
- 3.2 Restrictive lung disease
- 3.3 Other lung disease with mixed restrictive/obstructive pattern
- 3.4 Hypoxia without lung disease
- 3.5 Developmental lung disorders

4 PH due to pulmonary artery obstructions (table 6)
- 4.1 Chronic thromboembolic PH
- 4.2 Other pulmonary artery obstructions

5 PH with unclear and/or multifactorial mechanisms (table 7)
- 5.1 Haematological disorders
- 5.2 Systemic and metabolic disorders
- 5.3 Others
- 5.4 Complex congenital heart disease

PAH: pulmonary arterial hypertension; PVOD: pulmonary veno-occlusive disease; PCH: pulmonary capillary haemangiomatosis; LVEF: left ventricular ejection fraction.

Figure 5 Dernière classification des groupes d'HTP (Simmoneau et al, 2019)

2.2.1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

Point détaillé paragraphe 2.4

2.2.2. Hypertension pulmonaire secondaire à une défaillance cardiaque gauche

Le groupe 2 des HTP comprend les patients atteints d'une cardiopathie du cœur gauche ou de malformations valvulaires qui conduisent à une HTP. Ces pathologies entrainent une augmentation de la pression auriculaire gauche qui à son tour, entraine une transmission rétrograde de cette augmentation de pression jusqu'à l'AP. Elles sont définies par une hypertension post-capillaire (PCP) >15mmHg. C'est la cause d'HTP la plus fréquente.

2.2.3. Hypertension pulmonaire due à des maladies respiratoires et/ou à une hypoxie

Le groupe 3 des HTP représente les patients souffrant d'une hypoxie alvéolaire résultant d'une maladie respiratoire chronique telle que la bronchectasie chronique, la mucoviscidose, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la fibrose pulmonaire ou d'une maladie avec altération du contrôle respiratoire. L'hypoxie peut également venir d'une vie à haute altitude de longue durée. La majorité des HTP de ce groupe sont modérées (<35mmHg)

2.2.4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique

Le groupe 4 des HTP représente les patients souffrant d'une obstruction proximale et/ou distale des APs d'origine thromboembolique. La principale maladie de ce groupe est la maladie thromboembolique chronique (CTEPH), où des thrombus vont s'accumuler dans les APs. C'est le seul type d'HTP qui peut être soigné par une chirurgie appelée thrombo-endartériectomie pulmonaire, consistant à enlever les thrombus formés.

2.2.5. HTP d'étiologies indéfinies ou multifactorielles

Ce groupe 5 est constitué de diverses pathologies pouvant être associées à l'apparition d'une HTP, mais dont les mécanismes aboutissant à la pathologie restent incertains, telles que des sarcoidoses, la lymphangioléiomyomatose, des maladies hématologiques, des maladies métaboliques...

2.3. Définition de l'HTAP

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond au groupe 1 de la classification des HTP. Elle est caractérisée par un intense remodelage des APs de petit calibre (<500µm). Elle se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) > 20 mmHg, une pression pulmonaire d'occlusion (PAPO) < 15mmHg et des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) > 3 unités Wood.

2.4. Classification de l'HTAP

2.4.1. HTAP idiopathique (HTAPi)

Ce groupe correspond aux patients atteints d'HTAP et dont la cause est pour le moment inconnue.

2.4.2. HTAP héritable (HTAPh)

Il regroupe l'ensemble des patients HTAP dont une cause génétique a pu être associée, cela peut être une HTAP familiale ou sporadique. À ce jour, une vingtaine de gènes ont été identifiés comme étant associés à l'apparition d'HTAP (voir partie 4).

2.4.3. HTAP induite par des médicaments ou des toxiques

Plusieurs médicaments ou drogues ont été identifiés comme ayant un lien avec le développement d'une HTAP (figure 6).

Table 1. Risk level of drugs and toxins known to cause pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease

Definite	Likely	Possible
Aminorex	Dasatinib	Cocaine
Fenfluramine	Amphetamines	Phenylpropanolamine
Dexfenfluramine	Methamphetamines	St John's Wort
Toxic rapseed oil	L-Tryptophan	Amphetamine-like drugs
Benfluorex		IFN-α and IFN-β
		Some chemotherapeutic agents such as alkylating agents (mitomycin C, cyclophosphamide)[a]

IFN, interferon. Adapted from [1].
[a]Alkylating agents may cause pulmonary veno-occlusive disease.

Figure 6 Tableau des drogues et toxines connues pour induire une HTAP (Weathrald et al 2017)

Parmi cette liste, il y a des anorexigènes (aminorex, fenfluramine, benfluorex), des drogues dures (amphétamines, métamphétamines, cocaïne...)(Garg et al. 2017), et des médicaments utilisés dans le traitement de differents cancers tels que le dasatinib, inhibiteur de tyrosine kinase et utilisé en traitement de la leucémie myéloïde chronique (Montani et al. 2012; Weatherald, Chaumais, et Montani 2017) et des agents alkylants tels que la mitomycin C ou

le cyclophosphamide (Certain et al. 2021; Ranchoux, Günther, et al. 2015; Frédéric Perros et al. 2015)

2.4.4. HTAP associée à une pathologie sous-jacente

Ce groupe comprend les HTAP liées à d'autres pathologies telles que : une infection au VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), des connectivites, une hypertension portale, une cardiopathie congénitale ou une infection parasitaire telle qu'une schistosomiase.

2.4.5. HTAP avec réponse aux inhibiteurs de canaux calciques.

Durant le diagnostic de l'HTAP par cathétérisme du VD, un test de réponse aux vasodilatateurs est effectué. Du monoxyde d'azote (NO) va être inhalé par le patient. Lorsque le test est positif (baisse de plus de 20% de la PAPm)(Sitbon et al. 2005), cela veut dire que le patient est répondeur aux vasodilatateurs et son traitement va être orienté vers des inhibiteurs de canaux calciques qui vont permettre de bloquer l'entrée de calcium dans les cellules vasculaires pulmonaires, ce qui entraine une vasodilatation de l'artère pulmonaire. Les inhibiteurs calciques utilisés sont le diltiazem, le nifedipine ou l'amlodipine. Une étude de Sitbon et al, a montré que sur une cohorte de 557 patients atteints d'HTAP, seul 70 avaient répondu au test de vasoréactivité (12,6%). Lorsque ce traitement peut être maintenu à long terme, on observe une forte amélioration de leur survie (95% à 5 ans) (Sitbon et al. 2005).

2.4.6. HTAP avec une atteinte veineuse pulmonaire : maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) ou hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP)

La MVOP est principalement caractérisée par une atteinte des capillaires et veines pulmonaires, mais également des artères pulmonaires. Elle se caractérise aussi par une augmentation des PAPm > 20mmHg et un PAPO < 15 mmHg et on observe de plus une obstruction du lit capillaire pulmonaire dû à un épaississement des parois où se déroulent les échanges gazeux. C'est pourquoi une des caractéristiques des patients diagnostiqués pour la MVOP est une DLCO (capacité de diffusion du monoxyde de carbone) très diminuée (<50%) ce qui montre une forte diminution de la capacité du transfert des gaz entre les alvéoles et les capillaires pulmonaires. La MVOP peut être héritable, le gène *EIF2AK4* a été retrouvé muté dans plusieurs familles de MVOP. Ce sont des mutations bi-alléliques perte de fonction et qui sont autosomique récessives. La MVOP est dite sporadique quand la maladie se développe suite à une exposition chronique à des solvants organiques (trichloréthylène) ou des agents

chimio thérapeutiques (cyclophosphamide ou mitomycine C). Les patients atteints de MVOP peuvent être séparés en deux classes distinctes : dans un premier groupe, des personnes jeunes au diagnostic (27±10) venant de familles avec d'autres cas de MVOP et qui ont une mutation de *EIF2AK4* (Montani et al. 2016) *;* Il n'y a pas de prédominance de sexe pour le développement de la maladie chez les patients atteints de MVOP héritables. L'autre groupe concerne les cas sporadiques de MVOP qui sont souvent des hommes, plus âgés que dans le premier groupe, au diagnostic (67.9±8.1) (Montani et al. 2015) et qui ont eu une exposition professionnelle à des solvants organiques. Le caractère très sévère de cette pathologie et le manque d'efficacité des traitements classiques de l'HTAP chez ces patients entrainent un recours à la transplantation pulmonaire rapide après le diagnostic (11.8 mois en moyenne) pour les patients éligibles.

2.4.7. HTAP persistante du nouveau-né

Elle affecte les nouveau-nés dont les APs restent vasoconstrictées voir obstruées après la naissance. Cela entraine une forte diminution du débit sanguin ce qui amène une hypoxémie et une augmentation des pressions pulmonaires. Il existe plusieurs causes possibles, une asphyxie périnatale notamment due à la présence de méconium dans la trachée, la fermeture précoce du canal artériel, qui peut être due à la prise d'AINS (Anti Inflammatoires non-stéroïdiens) par la mère ou une hypoplasie pulmonaire. La mortalité globale varie entre 10 et 60%. Un quart de ces enfants présenteront plus tard un retard de croissance et plusieurs déficits sensoriels et moteurs.

2.5. Épidémiologie de L'HTAP

L'HTAP est une maladie rare, sa prévalence est de 15-50 cas par million de personnes dans le monde (Lau et al. 2017). En occident, c'est l'HTAP associée à une connectivite qui est la forme prédominante (15-30%) puis l'HTAP associée à une cardiopathie congénitale (10-23%) et HTAP portale (5-10%) (Lau et al. 2017). En Chine c'est l'HTAP associée à une cardiopathie congénitale qui représente 43% des HTAP. Enfin au Brésil les infections au schistosomiase sont fréquentes et c'est donc l'HTAP associée à cette pathologie qui est la plus fréquente (20%) (Lau et al. 2017). L'âge moyen du diagnostic est de 35±15 ans, néanmoins de récentes études tendent à montrer une augmentation de cas d'HTAP idiopathique chez des sujets plus âgés (52±15). La plupart des registres montrent une proportion de femmes atteintes d'HTAP plus

importante (56-80%). Le ratio femme/homme est plus important chez les patients plus jeunes (2,3 :1) et ce ratio diminue chez les patients de plus de 75 ans (1,2 :1) ce qui peut être lié à la ménopause et la diminution de production des hormones féminines (Cheron et al. 2021). De plus les porteurs de mutations *BMPR2* ont plus de chance de développer une HTAP si ce sont des femmes (42% vs 14%). Cependant, les hommes atteints d'HTAP ont une moins bonne survie (W.-T. N. Lee et al. 2012). L'amélioration des traitements de l'HTAP a permis une amélioration de la survie des patients depuis 30 ans en passant d'une survie à 3 ans après diagnostic de 34% en 1991 (D'Alonzo et al. 1991) à une survie de 83% à 3 ans dans une cohorte de patients de 2007 à 2013.

2.6. Diagnostic

Il n'existe pas de signes cliniques particuliers de l'HTAP. Cela en fait une maladie qu'il peut être difficile de diagnostiquer. Le symptôme principal est un essoufflement à l'effort (dyspnée), qui peut souvent être négligé par les patients et retarde souvent la prise en charge. Lorsqu'un patient est suivi pour une suspicion d'HTAP, différents examens peuvent être réalisés. Une échographie cardiaque transthoracique couplée au doppler va permettre de visualiser s'il y a une élévation de la PAPm et souvent une dilatation des cavités du VD. La radiographie du thorax permet souvent de visualiser une hypertrophie des branches proximales des APs. Néanmoins, l'examen permettant le diagnostic final d'HTAP est un cathétérisme du VD. Il permet de visualiser si la PAPm est supérieure à 20 mmHg. La suite de la prise en charge repose sur plusieurs examens cliniques qui vont permettre d'affiner le diagnostic et de prendre les décisions thérapeutiques adéquates. Un interrogatoire est réalisé afin de connaitre des antécédents de maladies et syncopes. L'importance de la dyspnée va être évaluée et va permettre de classifier les patients en 4 groupes de la NYHA (New York Heart Association). Ce test est couplé à un test d'effort qui est souvent un test de marche de 6 minutes (TM6). Ces résultats donnent un facteur de pronostic important qui va permettre la mise en place du traitement le plus adéquat et le test de marche permet également de suivre la réponse du patient au traitement. La réalisation d'un angioscanner va permettre d'identifier des anomalies et malformations vasculaires pulmonaires ainsi que la perméabilité des vaisseaux. Cela peut permettre de suspecter une maladie veino-occlusive pulmonaire ou une HTP hypoxique.

3. Les canaux ioniques dans la circulation pulmonaire

3.1. Rôle des canaux ioniques sur le tonus vasculaire

Le tonus artériel pulmonaire est dépendant de l'état de contraction des CML-APs. La contraction des CML-APs est en partie contrôlée par leur potentiel de membrane qui est dépendant des gradients électriques et chimiques des ions présents de part et d'autre de la membrane. Les principaux ions impliqués sont les cations : Na^+, Ca^{2+}, K^+ et les anions : Cl^-. Ces ions passent au travers de la membrane plasmique par des canaux ioniques sélectifs. C'est donc la fonction de ces canaux ioniques qui agit sur la valeur du potentiel de membrane et donc de l'état contractile des CML-APs (figure 7).

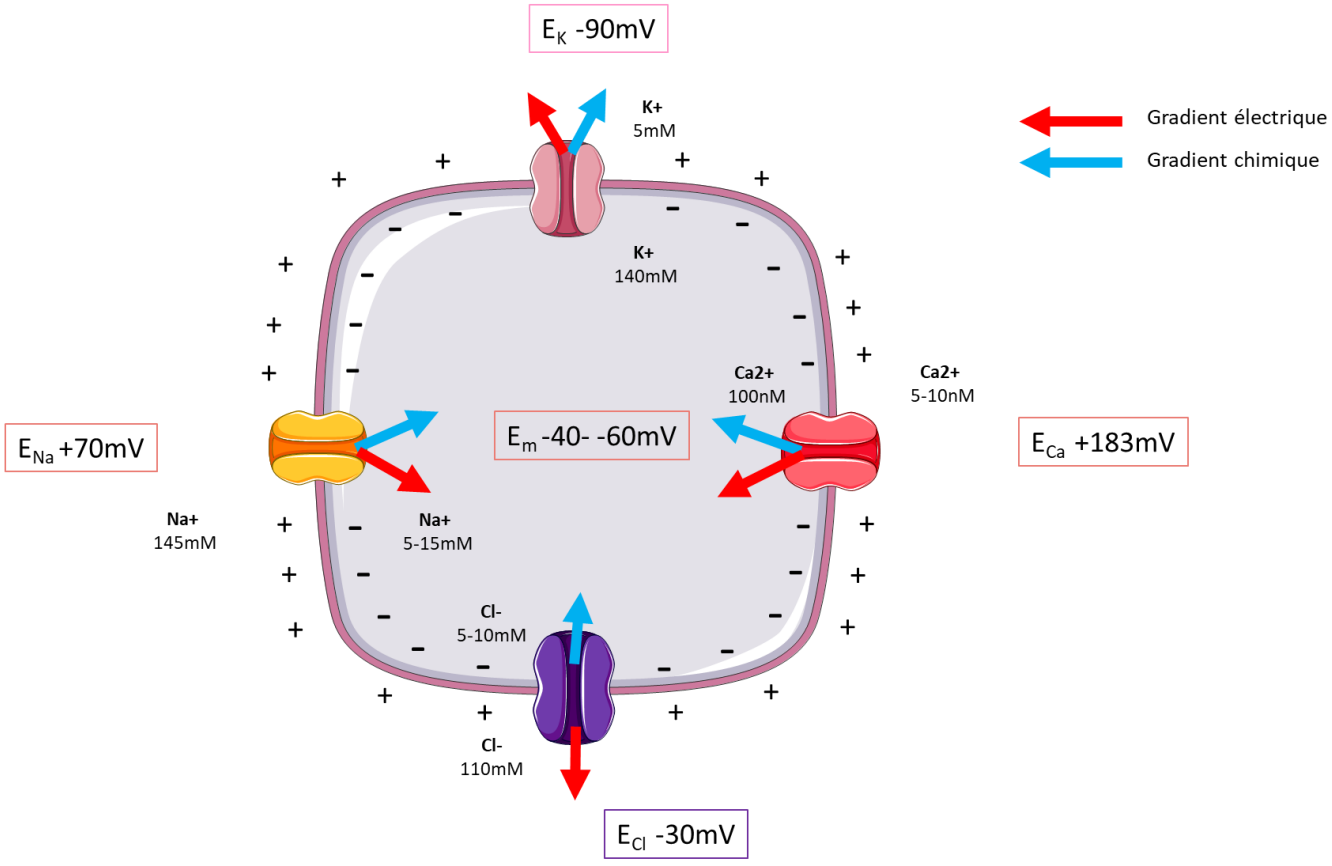


Figure 7 Gradients chimiques et électriques des principaux ions dans les cellules musculaires lisses humaines (Adapté de lambert et al. 2018)

Le potentiel de repos membranaire des CML-APs varie entre -40 et -60 mV, ce qui est proche du potentiel d'équilibre des ions K^+ (-90mV). En condition physiologique, la concentration de K^+ intracellulaire est beaucoup plus importante que la concentration extracellulaire (140Mm

vs 5mM). Au potentiel de repos des CML-APs, les canaux potassiques sont ouverts et permettent la sortie de K^+ de la cellule. Cette sortie de K^+ permet de maintenir le potentiel de membrane des cellules au potentiel de repos et maintient également les canaux calciques voltage dépendants (CCVD) fermés. Cette fermeture implique qu'il n'y a pas d'entrée de calcium dépendant du potentiel membranaire, les CML-APs sont donc dans un état relâché et les APs sont vasodilatées.

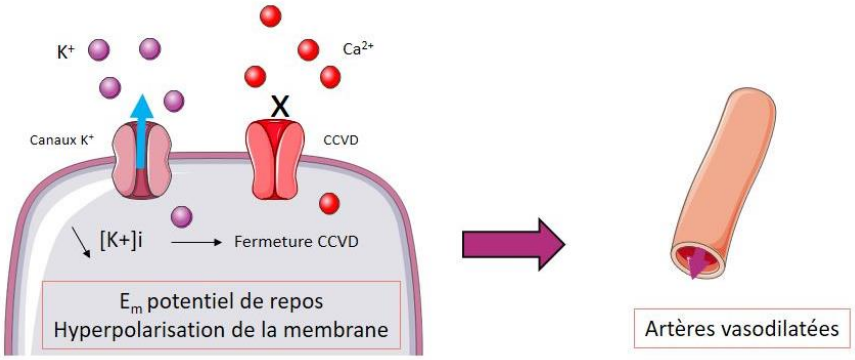


Figure 8 Implication des canaux K^+ et Ca^{2+} dans la relaxation des artères pulmonaire

Lorsque les canaux K^+ sont fermés, il n'y a plus de sortie de K^+ de la cellule, cela entraine une augmentation de la charge positive à l'intérieur de la cellule ce qui dépolarise la membrane plasmique. Cette dépolarisation permet l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants (CCVD) et donc une entrée de calcium dans la cellule. Cela a pour conséquence de contracter les CML-APs et donc de contracter les artères pulmonaires.

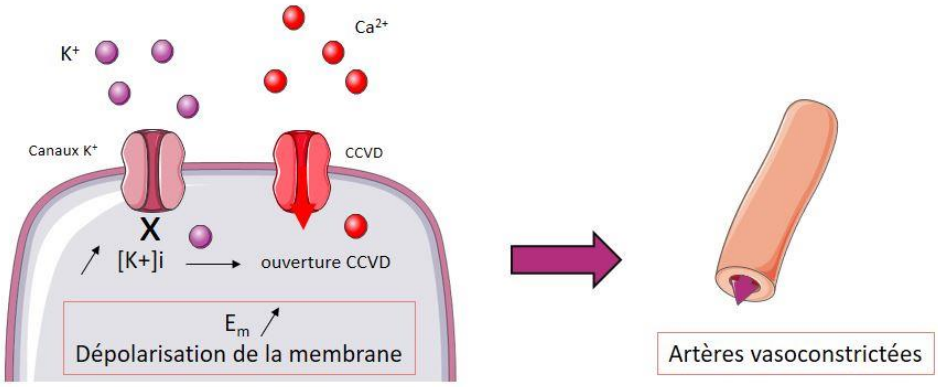


Figure 9 Implication des canaux K^+ et Ca^{2+} dans la contraction des artères pulmonaires

Avec l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$), le Ca^{2+} va pouvoir se lier à la calmoduline (CAM). 4 ions Ca^{2+} peuvent se fixer sur une CAM. Cette liaison Ca^{2+}/CAM

va entrainer l'activation de la MLCK (myosin light-chain kinase) qui va venir phosphoryler la myosine à chaine courte II (MLCII) via l'activité ATPase de la myosine. Ces phosphorylations permettent la formation de fibres d'actine-myosine à l'origine de l'état contractile des CML-APs (Applegate et Pardee 1992). L'activité de la MLCK est contrebalancée par celle de la MLCP (myosin light-chain phosphatase) (Ribeiro-Silva, Miyakawa, et Krieger 2021) qui déphosphoryle la MLC et bloque la contraction des CMLs. Ces deux enzymes sont très régulées dans les CMLs-AP, la MLCP est inhibée par la kinase Rho et par la protéine kinase C. À l'inverse, elle va être activée par les protéines kinase activées par l'AMP et le GMP cyclique (PKA et PKG)

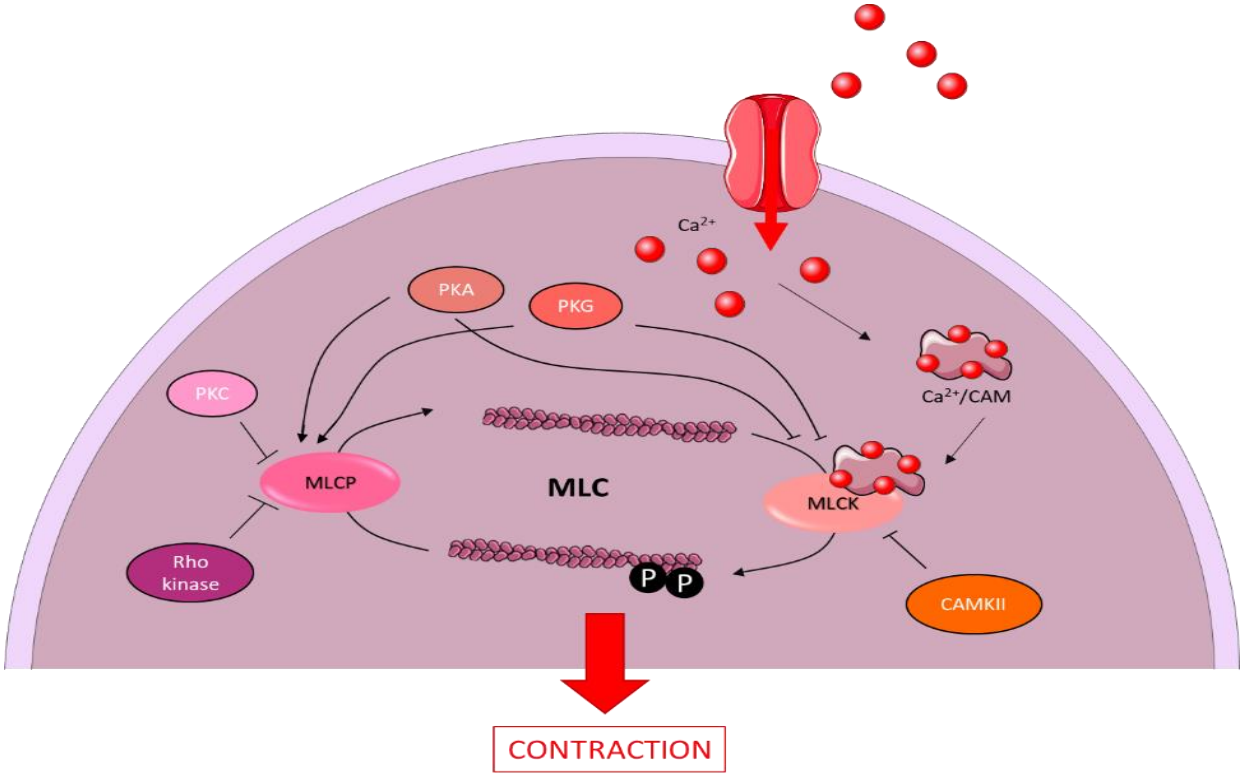


Figure 10 Schéma représentatif de la voie de signalisation dépendant du calcium qui entraine la contraction des CML-APs

(Martinsen, Dessy, et Morel 2014). La MLCK est régulée négativement par PKA et PKG ainsi que par CAMKII une kinase activée par le complexe Ca^{2+}/CAM (Kamm et Stull 2001).

3.2. Définition et classification des canaux ioniques

3.2.1. Les canaux potassiques

3.2.1.1. Les canaux potassiques à rectification entrante (K_{ir})

Il existe 7 sous-familles de canaux Kir, se nommant de Kir1.x à Kir7.x. Ils sont composés de deux domaines transmembranaires qui forment le pore du canal. Leur rôle principal est un influx de K^+ (avec rectification entrante) afin de maintenir le gradient chimique en K^+ des cellules. En ce sens, une augmentation de K^+ extracellulaire entraine une augmentation de leur activité. Ils sont régulés par des molécules intracellulaires telles que le Mg^{2+} et les polyamines (Hibino et al. 2010). Les différentes sous-familles de Kir présentent une grande diversité de localisation, d'activation et de fonction.

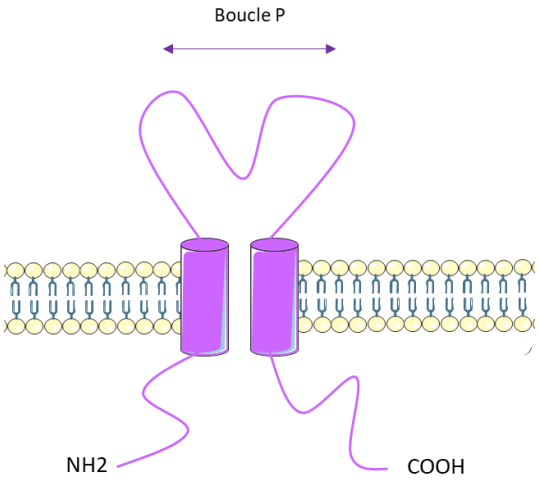


Figure 11 Schéma d'un canal Kir

Le canal Kir1.1 est surtout exprimé dans les cellules polarisées rénales et participe au maintien du potentiel de repos (HEBERT et al. 2005). Les canaux Kir2.x dits canaux Kir « classiques » sont constitutivement activés et se retrouvent surtout dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque. Ils controlent le potentiel de repos des cardiomyocytes ainsi que la durée du potentiel d'action en contribuant notamment au maintien de la phase de plateau du potentiel d'action des cardiomyocytes (Hibino et al. 2010). Les canaux Kir3.x sont activés par les protéines G et s'associent en homo ou hétérotétramères. Ils peuvent être activés par le GTP intracellulaire. Ils sont exprimés au niveau du cerveau (Grosse et al. 2003). Les canaux Kir4.x et Kir5.1 sont notamment présents dans les cellules gliales et jouent un rôle dans le contrôle de l'homéostasie potassique (Higashi et al. 2001). Les canaux Kir6.x sont dits sensibles à l'ATP intracellulaire et sont appelés KATP (voir au point 3.1.1.2). Les canaux Kir7.1sont exprimés à la membrane des diverses cellules épithéliales (Döring et al. 1998).

Dans les cellules musculaires lisses

Le courant Kir fut découvert pour la première fois dans les CMLs au niveau d'artères cérébrales de rats (Quayle et al. 1993). Deux études ont mis en évidence l'expression de Kir2.1 et Kir2.2 dans les CMLs d'artères cérébrales, coronaires et mésentériques (Park, Han, et Earm 2008; Smith et al. 2008). Ils contribuent au contrôle du tonus vasculaire des vaisseaux de petit calibre. Il a également été démontré que l'ARNm de Kir2.1, Kir2.2 et Kir2.4 était présent dans les CML-APs humaines. La caractérisation du courant Kir dans ces cellules décrit majoritairement le courant Kir2.4 (Tennant et al. 2006).

Dans les cellules endothéliales

L'expression de plusieurs canaux Kir a été retrouvée dans des cultures primaires de CE-APs de bœuf, tel que Kir2.1, Kir2.2, Kir2.3, Kir2.4, Kir3.1, Kir4.1 et Kir5.1. Par contre Kir1.1 n'a pas été détecté. Cette étude a démontré que l'expression de Kir2.1 est régulée par la CaMKII (Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II) (Qu et al. 2015).

En 2017, il a été découvert que Kir2.1 était exprimé dans les CE artérielles mésentériques de souris où sa fonction est essentielle pour la vasodilatation NO-dépendante et la phosphorylation de la eNOS (endothelial nitric oxyde synthase). En utilisant un modèle transgénique de souris Kir2.1$^{+/-}$, Ahn et al ont montré que Kir2.1 joue un rôle majeur dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par le flux sanguin (Ahn et al. 2017). Ce phénomène et l'expression de toutes les isoformes de KirX.X restent inconnus dans les CE-APs ainsi que leur contribution à la pathogenèse de l'HTAP.

3.2.1.2. Les canaux potassiques ATP-dépendant (KATP)

Les canaux KATP sont des hétéro-octameres qui se composent de quatre sous-unités Kir6.x (Kir6.1 ou Kir6.2 codés par *KCNJ8* et *KCNJ11* respectivement) qui forment le pore du canal potassique et quatre sous-unités régulatrices composées d'un récepteur aux sulfonylurées SURX (SUR1, SUR2B ou SUR2A). Les gènes codant pour les protéines SUR sont :

-*ABCC8* pour SUR1

-*ABCC9* pour SUR2A et SUR2B qui résultent de l'épissage alternatif du dernier exon de *ABCC9*)

La séquence des gènes *ABCC8* et *KCNJ11* se situe à la suite sur le chromosome 11 de même que les gènes *ABCC9* et *KCNJ8* se situent à la suite sur le chromosome 12. Cela suggère que la

régulation de leur expression pourrait déjà se faire à l'étape de la transcription (Nichols, Singh, et Grange 2013).

SUR2A et SUR2B ont une homologie de 99%, leur seule différence étant les 42 derniers acides aminés au niveau du C terminal de SUR2A et SUR2B. SUR1 présentent environ 79% d'homologie avec les SUR2 (Figure 12).

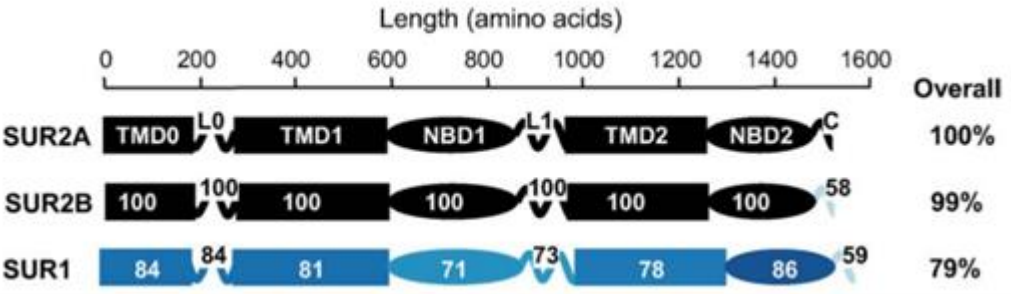


Figure 12 Pourcentage d'homologie entre les trois SURs qui composent les canaux KATP (Moreau et al 2005)

Les KATP sont co-assemblés de différentes manières selon le tissu cellulaire. Les sous-unités Kir6.x sont constituées de deux domaines transmembranaires typiques des canaux Kir. Les sous unités SUR appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) et sont constituées de 2 domaines transmembranaires (TMD), qui sont TMD1 et TMD2 composés de 6 domaines transmembranaires et d'un domaine TMD0 qui comporte 5 domaines transmembranaires. TMD0 correspond au lien physique entre Kir6.x et SUR (K. W. Chan, Zhang, et Logothetis 2003) et se joint au domaine TMD1 par une boucle cytoplasmique L0. Au niveau C-terminal de chaque domaine TMD1 et TMD2 se situe les domaines cytoplasmiques nucleotide binding domains (NBD1 et NBD2 respectivement) ou l'ATP et l'ADP peuvent se lier.

Les Kir6.X et SURX présentent un domaine RKR, qui est un motif de rétention dans le réticulum endoplasmique (RE) ce qui permet de s'assurer que seul un canal correctement assemblé accède à la membrane plasmique.

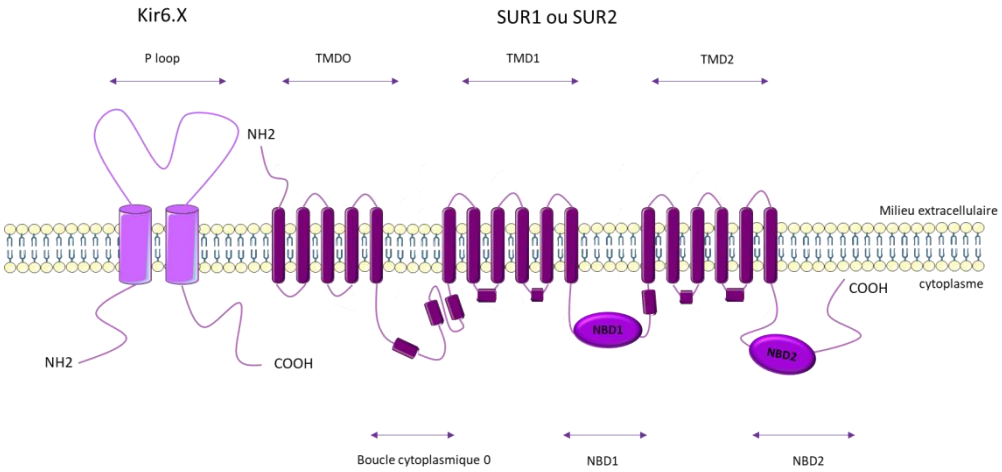


Figure 13 Schéma d'un canal KATP

Propriétés des canaux KATP

Les canaux KATP sont principalement régulés par l'état métabolique des cellules et donc par l'$[ATP]_i$. Une élévation de niveau de l'$[ATP]_i$ va bloquer l'ouverture des canaux KATP. L'ATP se lie aux SURs par les domaines NBD. L'hydrolyse de l'ATP en ADP couplée au Mg^{2+} ou AMP va permettre l'activation des KATP. Les ratios ADP/ATP et AMP/ATP représentent les régulateurs clés de l'activation des KATP. Il a été montré que le NBD1 de SUR1 a une plus forte affinité pour l'ATP que l'ADP, mais qu'à l'inverse le Mg-ADP se lie plus facilement sur le NBD2 et peut compenser le lien ATP-NBD1 (Ueda, Inagaki, et Seino 1997). De plus, le Mg-ADP a une meilleure affinité pour stimuler SUR1 et SUR2B que SUR2A et cela peut être dû aux 42 acides aminés en C-terminal de SUR2A (Matsuoka et al. 2000).

Il a également été mis en évidence que le zinc peut être un activateur de SUR1 et SUR2A (Prost et al. 2004).

De plus, l'association du PIP2 sur le canal Kir6.X est importante pour conserver le canal à un état ouvert (Fan et Makielski 1997).

L'activité des KATP est régulée par deux classes de molécules : les sulfonylurées qui vont inhiber l'ouverture des KATP (glibenclamide, tolbutamide, nateglinide...) et les « KATP channel opener » (KCO) qui activent l'ouverture des KATP (diazoxide, nicorandil, pinacidil…).

SUR1 et Kir6.2 se co-assemblent dans la plupart des tissus dans lesquels ils sont exprimés tels que le cerveau (Q. Zhang et al. 2018), le cœur (Lefer, Nichols, et Coetzee 2009), le pancréas (Koster et al. 2006) et le tissu vasculaire pulmonaire (Bohnen et al. 2018). SUR1 peut également se co-assembler et réguler le transient receptor potential melatonin 4 (TRPM4), qui est un canal cationique non sélectif. Cette interaction SUR1-TRPM4 a surtout été retrouvée

dans le système nerveux central et leur expression est augmentée en cas d'ischémie cérébrale (AVC, hémorragie cérébrale...). (Jha et al. 2021).

Cependant, TRPM4 est exprimé dans les CML-APs, supposant que SUR1/TRPM4 pourraient être co-assemblés dans le système vasculaire pulmonaire (X.-R. Yang et al. 2006).

SUR2A/Kir6.1 est connu pour être exprimé dans le tissu cardiaque. SUR2B/Kir6.1 ou Kir6.2 a été retrouvé au niveau vasculaire notamment dans les cellules musculaires lisses et cellules endothéliales systémiques et pulmonaires (Aziz et al. 2014; Cui et al. 2002).

Activateurs et inhibiteurs des KATP

Les différentes molécules pharmacologiques pouvant activer ou inhiber les KATP ont diverses affinités et séléctivités suivant la sous-unité régulatrice, SUR qui est couplée au canal (liste non exhaustive).

Inhibiteurs	**Classe chimique**	**IC50 inhibition Kir6.2/SUR1**	**IC50 inhibition Kir6.1/SUR2B**	**IC50 inhibition n Kir6.1/SUR2A**	**Reference**
Tolbutamide	Sulfonylurées	5µM	25 µM	280µM	(Dörschner et al. 1999; Gribble et al. 1998)
Glibenclamide	Sulfonylurées	4.2nM	0.3 µM	10µM	(Dörschner et al. 1999; Gribble et al. 1998)
Nateglinide	Dérivé d'acide benzoïque	0.1µM	>10µM	>10µM	(Chachin et al. 2003)
Activateurs	**Classe chimique**	**IC50 activation Kir6.2/SUR1**	**IC50 activation Kir6.1/SUR2B**	**IC50 activation Kir6.1/SUR2A**	**Reference**
Pinacidil	Cyanoguanidines	>1mM	2µM	10µM	(Satoh et al. 1998)
Diazoxide	Benzothiadiazines	10µM	30-60µM	>200µM	(Gribble et al. 1997)
Cromakalin	Benzopyrans	>1mM	inconnu	10µM	
Nicorandil	Nicotinamides	inconnu	inconnu	100µM	
Iptakalim	Dialkylamines	inconnu	inconnu	inconnu	
VU0071063	Dérivé de Xanthine	7.44µM	n'active pas	inconnu	(Kharade et al. 2019, 00)
NN414 (Tifenazoxide)	Dérivé du diazoxide	0.45µM	Pas d'activation à 100µM	Pas d'activation à 100µM	(Dabrowski et al. 2003)

Tableau 1 Spécificité des différents inhibiteurs et activateurs des KATP

Dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Au niveau des CML-APs peu d'études se sont intéressées à ces canaux. Cependant, il a été montré la présence de KATP dans les CML-APs de lapin (Clapp et Gurney 1991) sans faire la distinction entre les différents isoformes ou sous unités. De plus, l'activation des KATP par l'iptakalim (non sélectif des différents isoformes) dans les CML-APs de rats hypoxiques a reduit la prolifération cellulaire ainsi que l'expression de la PKC-α (Zuo et al. 2011).

Au niveau systémique, les études sont également souvent réalisées avec des molécules non sélectives des différents canaux, c'est pourquoi la plupart des études parlent de KATP au sens large. La présence de KATP dans les CMLs a également été mise en évidence par des mesures d'électrophysiologies dans des CMLs mésentériques de rat ou de lapin (Standen et al. 1989). Ces KATPs systèmiques jouent un role dans la régulation du tonus vasculaire. Dans les CMLs d'artère coronaire de cochon, il a été mis en évidence que l'hypoxie entrainait l'activation des KATP (Dart et Standen 1995). Plus tard, Quale et al ont démontré que dans les CMLs d'artère fémorale de rats, l'anoxie induisait l'activation des KATP (Quayle et al. 2006). La plupart des études ont mis en évidence une présence prédominante de SUR2/Kir6.1 dans les CMLs (Aguilar-Bryan et al. 1998) bien que toutes les sous-unités soient exprimées dans les CMLs, en fonction de leur localisation.

Dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires

Au niveau des CE-APs peu d'études se sont intéressées à ces canaux. Cependant il a été montré que de Kir6.2 était exprimé dans des CE-AP de rats et de bœufs, mais pas Kir6.1. De plus l'expression de Kir6.2 est augmentée lorsque les CE-APs sont soumises à un stress mécanique (Chatterjee et al. 2003).

Par contre au niveau systémique, les ARNs messager (ARNm) de Kir6.1, Kir6.2, SUR1 et SUR2 sont exprimés dans les CEs de différentes espèces comme dans le cœur de cobaye, l'aorte de rat ainsi que les microvaisseaux cérébraux, l'aorte de lapin et les artères coronaires humaines (Janigro et al. 1993; Katnik et Adams 1997; Mederos y Schnitzler et al. 2000; Yoshida et al. 2004).

La fonction des canaux KATP dans les CEs a été associée avec la libération de NO via l'action de l'adénosine sur les KATP (Kuo et Chancellor 1995). Il a aussi été rapporté que les KATP endothéliaux peuvent également agir directement sur la production de NO. Aziz et al a montré que dans les CEs aortiques et mésentériques de souris, les KATPs sont principalement

composés de SUR2B et Kir6.1 (Aziz et al. 2017). De plus des souris Kir6.1$^{-/-}$ dans les CEs ont permis de montrer que Kir6.1 contribue a la régulation de la pression systémique notamment en condition pathologique (régime riche en sel)(Yiwen Li et al. 2020), cela montre le potentiel rôle de protection des KATP endothéliaux pendant le développement de l'hypertension artérielle.

Le rôle des canaux KATP dans la physiopathologie de l'HTAP n'est pas connu. C'est pourquoi durant ma thèse, je me suis intéressée au rôle des SUR1/kir6.2 et SUR2/kir6.1 dans les CML-AP et CE-APs de patients contrôles et HTAP (voir exposé des travaux).

3.2.1.3. Les canaux potassiques voltage dépendants (K_v

Les canaux Kv sont des canaux K^+ dont leur activation est dépendante du voltage. Ils sont composés d'une sous unité α formée de 6 domaines transmembranaires dont 4 domaines (S1-S4) sont dits senseurs du voltage et deux domaines vont former le pore du canal (S5-S6). Ces domaines sont très conservés entre les sous-groupes de Kv. Une sous unité β s'ajoute à ce canal et se compose d'un domaine intracellulaire. Ces sous-unités β peuvent conférer des fonctions différentes au canal notamment en modifiant son expression, son activation et sa sensibilité à capter les variations de voltage (Bähring et al. 2001; McCormack et al. 1995). Les canaux Kv sont fonctionnels sous forme de tétramères. 12 sous familles de canaux K_v ont été décrits (Kv1-12)

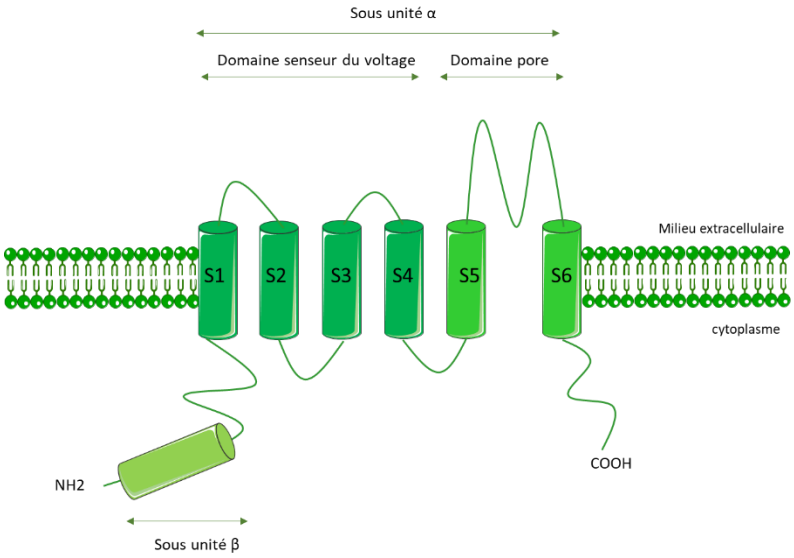


Figure 14 Schéma d'un canal Kv

Dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Il a été démontré que les CML-APs humaines exprimaient les ARNm de Kv1.1 Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1 et Kv9.3 ainsi que trois sous unités β : Kvβ1.1, Kvβ2 et Kvβ3 (X.-J. Yuan, Wang, Juhaszova, Golovina, et al. 1998). Plus récemment, 18 Kv ont été identifiés dans les CML-AP humaines. (Firth et al. 2011). Dans les CML-AP, il a été montré par des approches pharmacologiques non spécifiques (charybdotoxin et 4-Aminopyridine) que le courant I_{Kv} contribue au maintien du potentiel membranaire de repos (X.-J. Yuan 1995). Il a été démontré que le canal Kv1.5 est inhibé en conditions hypoxiques (S. L. Archer et al. 1998).

Plus récemment les ARNm de KCNQ1, KCNQ4 et KCNQ5 de la famille des Kv7.x ont été identifiés dans des CML-AP de rats. De plus, cette étude a montré que Kv7.4 joue un rôle dans le maintien du potentiel de membrane des CML-APs et que sa modulation pharmacologique pouvait réguler le tonus artériel pulmonaire (Joshi et al. 2009).Récemment, il a été mis en évidence que l'activation de la voie du NO (voie ciblée dans les traitements de l'HTAP) entraine une augmentation du courant porté par Kv7 (Mondéjar-Parreño et al. 2019). Une récente étude a mis en évidence que Kv7.4 contribue à la relaxation endothelium dependant des APs de rats via l'activation du GMPc (Al-Chawishly, Loveland, et Gurney 2022).

Dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires

Dans l'endothélium des petites APs, Hogg et al. a montré par immunomarquage la présence de Kv1.5 dans les CE-APs fraîchement isolées. Ils ont également montré par patch-clamp en configuration cellules entières, que 90% des CE-APs avaient un courant K^+ voltage-dépendant, correspondant à I_{Kv} et que 10% des CE-APs restantes avaient une signature électrophysiologique correspondant à I_{Kir} (Hogg, McMurray, et Kozlowski 2002).

Plus récemment, Babicheva et al a montré l'expression des protéines Kv1.5 et Kv1.2 dans les CE-APs humaines. Contrairement à leur expression dans les CML-APs humaines isolées de patients atteints d'HTAPi, ils ont montré que les expressions de Kv1.5 et Kv1.2 sont inchangées dans les CE-APs humaines isolées de patients atteints d'HTAPi (Babicheva et al. 2020).

3.2.1.4. Les canaux potassiques calcium dépendant (K_{Ca})

Les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} intracellulaire (K_{Ca}) sont composés de sept domaines transmembranaires pour les BK_{Ca} et six domaines trasnemembranaires pour les IK_{Ca} et SK_{Ca}. Deux de ces segments (S5 et S6) forment le pore du canal. Les canaux K_{Ca} possèdent un haut

degré d'homologie avec les canaux K_v. Leur principale différence est la sensibilité au $[Ca^{2+}]$ des K_{Ca}. Ils sont activés par une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire. Il existe trois sous-familles de canaux K_{Ca} :

- Les canaux à grande conductance (BK_{Ca}), qui ont une conductance comprise entre 100 et 300 pS, leur activation peut être régulée par le voltage et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Les canaux BK_{Ca} sont activés via la structure Ca^{2+} bowl.
- Les canaux à conductance intermédiaire (IK_{Ca}), qui ont une conductance entre 25 et 100 pS. Ces canaux IK_{Ca} ne sont dépendants que du $[Ca^{2+}]_i$. IK_{Ca} correspond a SK4 ou $K_{Ca}3.1$
- Les canaux de petite conductance (SK_{Ca}) ont une conductance entre 4 et 14 pS. Leur activation est indépendante du voltage (Guéguinou et al. 2014). Il existe trois SK_{Ca} : SK1, SK2 et SK3.

  Les canaux IKca et SKca sont activé par le calcium cytosolique via une calmoduline

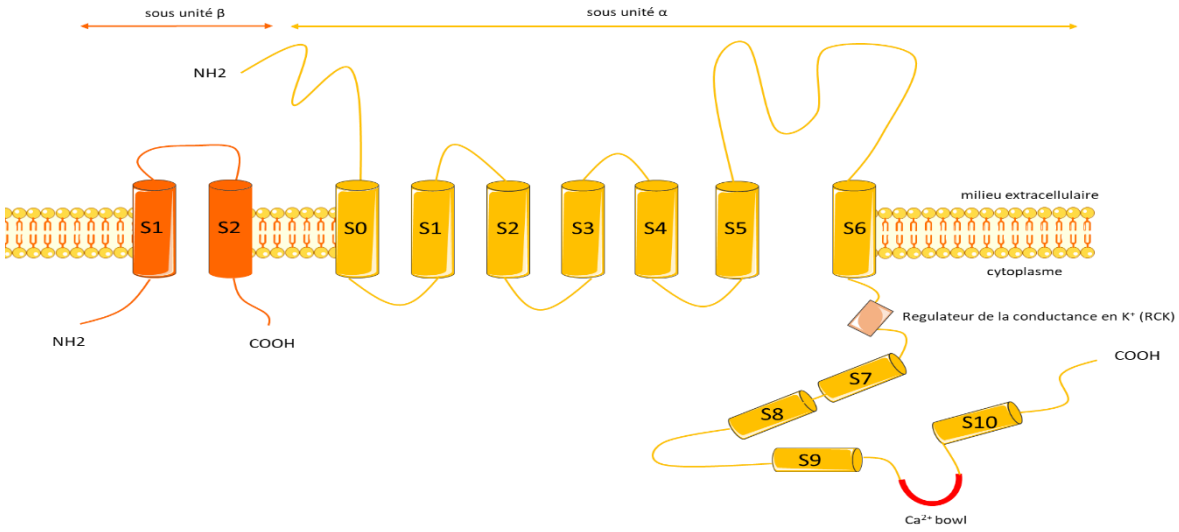


Figure 15 Structure d'un canal BK_{CA}

Dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Les sous-unités α1 et β1-4 des BK_{Ca} ont été détectées par RT-qPCR dans les CML-AP humaines. Les canaux SK2, SK3 et SK4 ont aussi été retrouvés exprimés par RT-qPCR dans les CML-APs humaines (Firth et al. 2011). Les canaux K_{Ca} (sensibles au charybdotoxine) dans les CML-APs de rats peuvent être activés via une enzyme cGK (cGMP-dependent K-channel K_{Ca} (sensibles

au charybdotoxine) qui est activée par une augmentation de GMPc, et ce processus entraine la vasorelaxation des CML-AP (S. L. Archer et al. 1994).

L'expression du gène *KCNMB1* qui code pour la sous unité β1 des BK_{Ca} a été retrouvée diminuée dans les CML-APs de patients atteints d'HTAPi (ARN messager et protéine). Il a été montré que le micro-ARN 29b (miR29b) et miR138 peuvent réguler négativement l'expression et l'activité du canal BKCaβ1 (Babicheva et al. 2020).

Dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires

Les sous-unités α1 et β4 des BK_{Ca} ont été mis en évidence dans les CE-APs de rats au niveau ARNm et protéine. L'activation des BK_{Ca} dans les CE-APs entraine la dilatation des APs. Cette vasodilatation est fortement réduite dans les APs dénudées d'endothélium ce qui montre l'importance des canaux BK_{Ca} dans les CE-APs pour la régulation du tonus vasculaire pulmonaire (Vang et al. 2010). KCa2.3 (SK3) et KCa3.1 (SK4) ont été identifiés dans les CE-APs humaines et l'activation de KCa3.1 contribue à la relaxation des APs de façon dépendante de l'endothélium (Kroigaard et al. 2012). L'expression des sous unités des BK_{Ca} α1, β1, β3 et β4 a été mis en évidence dans les CE-APs humaines alors que la sous-unité β2 ne semble pas exprimée. L'activation des canaux BK_{Ca} par un activateur pharmacologique NS1619 dans des CE-APs traités aux LPS entraine la diminution de la sécrétion de la cytokine CCL-2 (Zyrianova et al. 2021).

3.2.1.5. Les canaux potassiques à deux domaines pores (K_{2P})

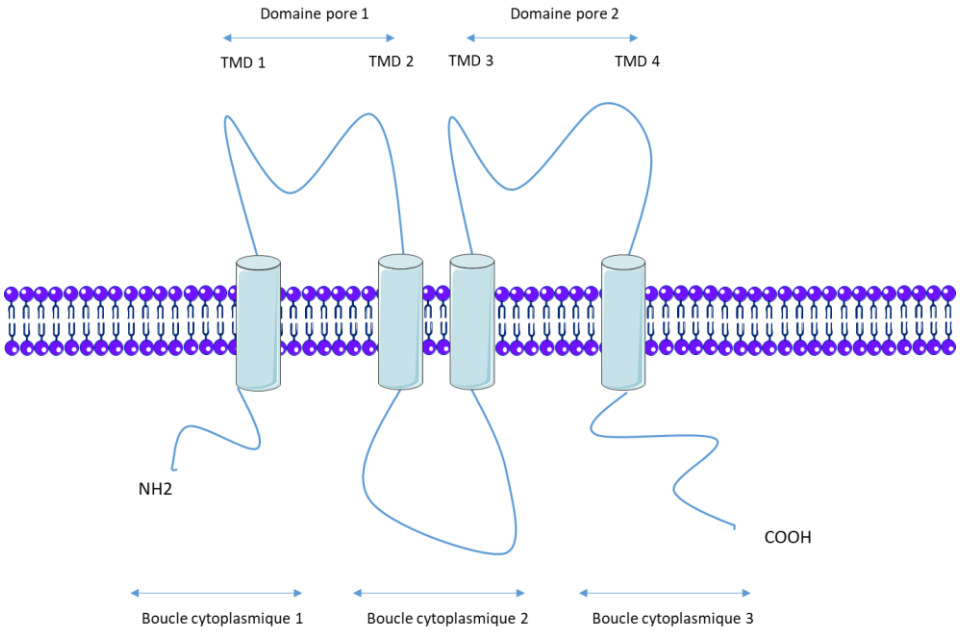


Figure 16 Schéma d'un canal K2P

Les canaux K^+ à deux domaines pores (K2P) sont aussi appelés canaux potassiques de fuite ou de fond. Six sous familles de canaux K2P ont été identifiés :

- Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K^+ channels (TWIK) => TWIK-1 (KCNK1), TWIK2 (KCNK6), KCNK7.
- TWIK-Related K^+ channel/TWIK Related Arachidonic Acid-Stimulated K^+ channels (TREK/TRAAK) => TREK-1 (KCNK2), TREK-2 (KCNK10), TRAAK (KCNK4).
- TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channels (TASK) => TASK-1 (KCNK3), TASK-2 (KCNK5), TASK-3 (KCNK9), TASK-5 (KCNK15).
- TWIK-related Alkaline pH-Activated K^+ channels (TALK) => TALK-1 (KCNK16), TALK-2 (KCNK17).
- Tandem pore domain Halothane-Inhibited K^+ channels (THIK) => THIK-1 (KCNK13), THIK-2 (KCNK12).
- TWIK-related spinal cord K^+ channels (TRESK/KCNK18)

En tout 15 membres de ces K2P ont été identifiés et leur appartenance aux sous-familles

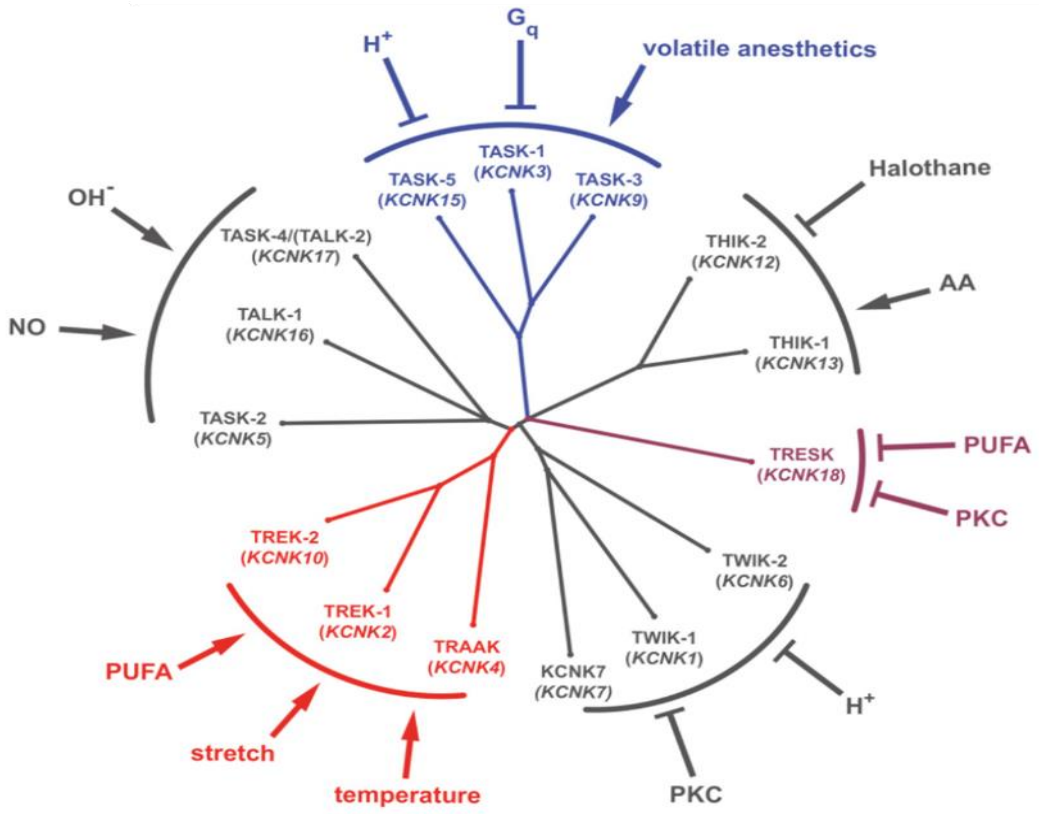


Figure 17 Liste des canaux K2P et de leurs propriétés physico-chimiques

dépend de leurs propriétés mécaniques et chimiques et leurs activation ou inhibition (Decher et al. 2021).

Les K2Ps sont composés de quatre domaines transmembranaires qui se dimérisent pour être fonctionnels et pour former le pore du canal.

Une étude a démontré la présence d'ARNm de TASK-1, TASK-2, THIK-1, TREK-2 et TWIK-2 dans les APs de rats. À l'inverse il a été mis en évidence que TASK-3, TRAAK, TREK-1 et TWIK-1 ne sont pas exprimés dans les APs de rats.

Des analyses *ex-vivo* sur APs de rats par microélectrodes ont permis de mettre en évidence que le changement de pH extracellulaire des APs de 7.4 à 6.4 ou 8.4 entrainait respectivement la dépolarisation (pH 6.4) ou repolarisation (pH 8.4) des CML-APs ce qui est lié à l'activation ou inhibition de TASK-1 qui est sensible au pH extracellulaire. De plus, l'ajout d'anandamide et bupivacaine des inhibiteurs non sélectifs de TASK-1 entrainent également une dépolarisation des membranes d'environ 10mV. Ces expériences ont suggeré l'implication de TASK-1 dans le maintien du potentiel de repos des CML-APs.

Propriétés de KCNK3/TASK-1

TASK-1 (codé par le gène *KCNK3*) peut être un homodimère ou un hétérodimère avec TASK-3 (codé par le gène *KCNK9*), néanmoins TASK-3 n'est pas exprimé dans les poumons (Lambert et al. 2019). KCNK3/TASK-1 peut être inhibé par plusieurs molécules et notamment le 4-aminopyridine. Par contre KCNK3/TASK-1 est insensible au tetraethylammonium (TEA, inhibiteur des Kv et KCa), au glibenclamide (inhibiteur des KATP), césium et à la $[Ca^{2+}]_i$. KCNK3/TASK-1 est spécifiquement inhibé par l'A293, un cardonamide aromatique développé par Sanofi. L'A1899 est aussi un inhibiteur sélectif de KCNK3/TASK-1 (Streit et al. 2011). KCNK3/TASK-1 peut également être inhibé par les anesthésiques locaux, le bupivacaine, l'anandamide, le doxaprem et PKTHPP. Ce sont des inhibiteurs non sélectifs de KCNK3/TASK-1. KCNK3/TASK-1 est également sensible aux variations de pH extracellulaire, en effet il est inhibé a 100% à pH 6.4, activé a 50-60% à pH physiologique (7.4) et totalement activé à pH 8.4. La fonction de KCNK3/TASK-1 peut également être réduite par un stress hypoxique (A. Olschewski et al. 2006). KCNK3/TASK-1 est inhibé par l'activation des récepteurs couplés au protéines Gq, tel que les récepteurs à l'endotheline1 ou la sérotonine (5-HT). L'ET-1 peut d'ailleurs stimuler une Rho-kinase pour inhiber la fonction de KCNK3/TASK-1 (Talley et al. 2000). L'activation de phospholipase C (PLC) via les protéines Gq peut inhiber KCNK3/TASK-1 via le diacylglycerol (DAG) (Tang et al. 2009). À l'inverse, KCNK3/TASK-1 peut être activée par la PKA et PKG, des kinases impliquées dans la vasorelaxation médiées par la prostacycline ou le NO (Toyoda et al. 2010). De plus, il a été démontré que KCNK3/TASK-1 peut être sensible au voltage, comme la majorité des autres K2P. Il a également été démontré que le domaine sensible au voltage dans les K2P est proche du filtre de sélectivité au K^+, près du pore du canal (Schewe et al. 2016).

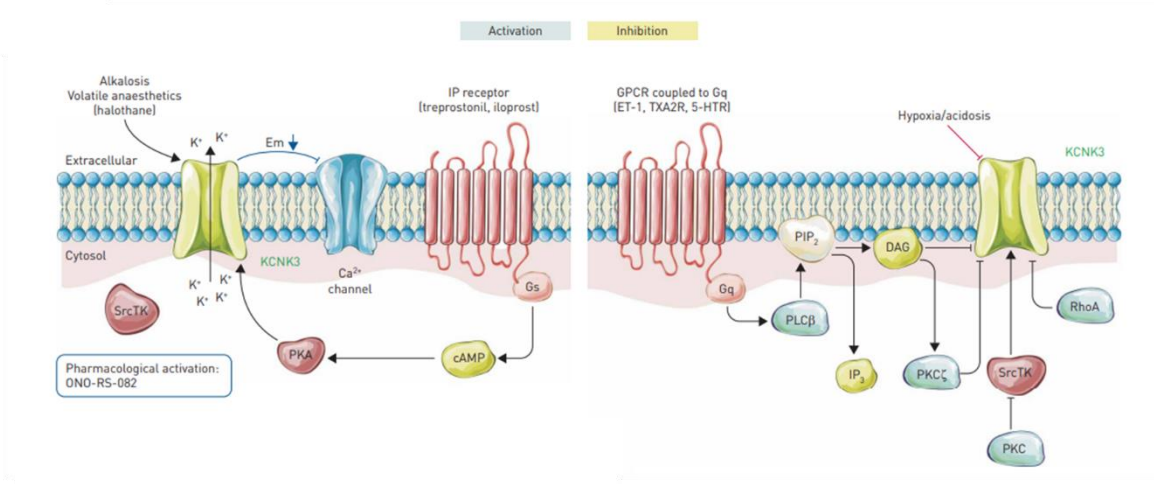


Figure 18 Voies de régulation de KCNK3/TASK-1 (Olschewski et al, 2017)

ET-1 : endothelin-1 ; Em : membrane potential ; PIP2 : phosphatidylinositol-4,5_biphosphate ; IP3 : Inostiol-1,4,5-triphosphate ; DAG : diacylglycerol ;PLC : phospholipase C ; PKC :protein kinase C ; SrcTK : Src family tyrosine kinase ; TXA2R : thromboxane A2Nreceptor ; 5-HTR : 5-hydroxytryptamine receptor ; PDGFR :platelet-derived growth factor rectpor : FGFR : fibroblast growth factor receptor ; RTk : receptor tyrosine kinases

Dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Le potentiel de repos des CML-APs est régulé par un canal K^+ qui est sensible au 4-aminopyridine (>1 mmol/L). De plus, le potentiel de membrane a une faible sensitivité au Ba^{2+} et la quinine et insensibles au TEA, glibenclamide aux inhibiteurs de $K_{ca.}$ Cette description ressemble fortement aux propriétés pharmacologiques de KCNK3/TASK1. Gurney et al a montré que KCNK3/TASK1 est exprimé dans les CML-APs de lapin (ARNm et protéine) et que le courant K^+ mesuré est sensible au pH, à l'halothane, au Zn^{2+} et amandamide, mais pas à la $[Ca^{2+}]_i$ (correspondant au courant KCNK3/TASK1). Ces résultats démontrent que KCNK3/TASK1 contribue au maintien du potentiel de repos des CML-APs (Gurney et al. 2003).

Par la suite, il a été mis en évidence que KCNK3/TASK1 est bien exprimé dans les CML-APs humaines, et que sa perte d'expression par siRNA entrainait une dépolarisation (-26mV siRNA KCNK3 contre -40mV siRNA contrôle) des CML-APs et une perte de sensibilité au pH ou à l'amandamide, confirmant les résultats précédents sur son rôle crucial dnas le maintien du potentiel de repos. Ils ont également mis en évidence qu'il est sensible à l'hypoxie et qu'il peut être inhibé par l'endothéline-1 (A. Olschewski et al. 2006; Tang et al. 2009).

La création d'un double KO TASK-1/TASK-3 chez la souris a permis d'identifier que KCNK3 est bien exprimé dans les APs de souris, mais est non fonctionnel au niveau des CML-APs (Manoury et al. 2011).

Dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires

C'est en 2004 que par immunomarquage sur des APs de rats, on observe la présence de KCNK3 et KCNK5 dans les CE-APs, mais en proportion plus faible que dans les CML-APs. Il n'y a pas d'expression de TREK-1 et TWIK-2. Par la suite, par patch clamp il a été mis en évidence que KCNK3/TASK1 est bien exprimé dans les CE-APs de rats et que sa fonction est fortement réduite dans les CE-APs 7 jours d'exposition à la monocrotaline (MCT)(Antigny et al. 2016).

Le rôle de KCNK3 dans les CML-APs et CE-APs reste peu connu, c'est pourquoi durant ma thèse nous avons réalisé une analyse protéomique sur des CML-APs et CE-APs transfectées avec un siRNA KCNK3 pour analyser, sans a priori, l'effet de la perte de KCNK3 sur les différentes voies de signalisation cellulaires et plus globalement l'impact sur différents processus biologiques *(*voir exposé des travaux).

3.2.2. Les canaux calciques

L'ion Ca^{2+} est primordial dans la plupart des processus cellulaires, c'est pourquoi sa $[Ca^{2+}]_i$ est finement régulée et doit rester à des niveaux très bas de l'ordre de 100nM. L'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ entraine des réactions différentes selon la concentration, le type cellulaire, la durée et cela va de la régulation de l'exocytose, de la contraction et du métabolisme cellulaire à la régulation de la migration cellulaire, la prolifération, la mort cellulaire et la transcription de gènes. Tous ces processus cellulaires sont médiés par des protéines sensibles aux variations de $[Ca^{2+}]_i$ tels que des récepteurs (récepteurs couplés aux protéines G), des canaux sensibles au Ca^{2+}, des effecteurs de Ca^{2+} (calmoduline, calcineurine, etc…), et des enzymes (Berridge, Bootman, et Roderick 2003).

La $[Ca^{2+}]_i$ peut être modulée par des influx calciques provenant du milieu extracellulaire ou des réserves internes (réticulum endoplasmique (RE) ou sarcoplasmique (SR)).

À la membrane plasmique, il existe trois grands types de canaux calciques (Figure 19) :

- Les canaux calciques voltage dépendants (CCVD). Ces canaux comprennent notamment les canaux Ca^{2+} de type L (Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 et Cav1.4), de type N (Cav2.1) et de type T (Cav3.1, Cav3.2 et Cav3.3).
- Les canaux calciques dépendants des stocks de Ca^{2+} (Store-operated Ca^{2+} entry SOCE). Ces canaux comprennent les protéines STIM, des senseurs du calcium réticulaire (STIM1 et STIM2) et les canaux Orais (Orai1, Orai2 et Orai3) et TRPCs (TRPC1-7).
- Les canaux calciques indépendants du voltage et des stocks calciques (non voltage-dependent store-independent Ca^{2+} entry SICE ou receptor-operated Ca2+ entry (ROCE)). Ces types de canaux sont composés des mêmes protéines que les canaux SOCE.

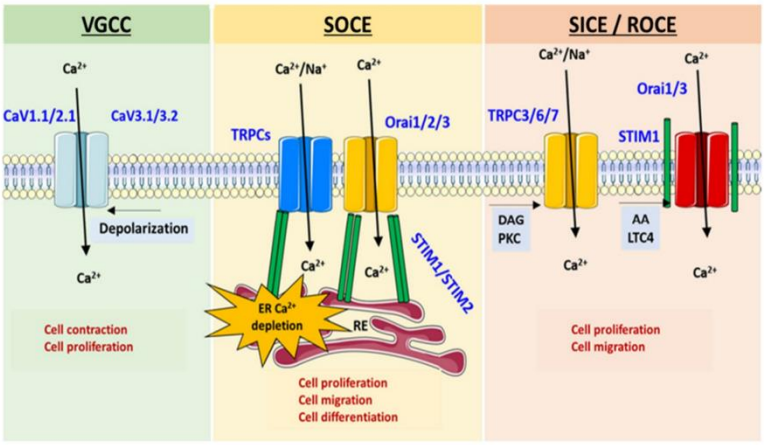


Figure 19 Schéma des familles de canaux calciques (Lambert et al. 2018)

3.2.3. Les canaux chlore

Les ions chlorures (Cl^-) jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques comme le maintien du potentiel de repos, la régulation du volume cellulaire ou du pH. Il existe diverses protéines de transports du Cl^-.

Au potentiel de repos des CML-APs (entre -40mV et -60mV) les ions Cl^- vont participer au maintien du potentiel avec une entrée de Cl^- selon leur gradient chimique (110mM de chlore extracellulaire et 5mM de chlore intracellulaire) en grande partie dû aux transporteurs $Na^+/K^+/2Cl^-$ ou Cl^-/HCO_3^-. Le potentiel d'équilibre du Cl^- dans les CML-APs est plus positif (entre -20mV et -30mV) que le potentiel de repos des cellules. L'ouverture des canaux chlores entraine alors une sortie d'ions Cl^- qui dépolarise la membrane plasmique, permet l'ouverture des canaux calcique voltage dépendant et donc la contraction des CML-APs (Bulley et Jaggar 2014).

Il existe 5 familles de canaux chlores :

- Protéine transmembranaire 16 (TMEM16/anoctamin)
- Bestrophines
- Les canaux chlores voltage dépendant (CLC)

- CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
- Canaux chlores dépendant d'un ligand (Récepteurs GABA et glycine)

Dans le système vasculaire pulmonaire et plus précisément dans l'HTAP, ce sont surtout les canaux TMEM16 et CFTR qui ont été étudiés pour le moment.

Il a été mis en évidence que l'expression de TMEM16 est augmentée dans les CML-APs de patients atreints d'HTAPi, ce qui entraine une augmentation de courant Cl^- corrélé a une augmentation de la prolifération des CMLs (Papp et al. 2019). De plus, une récente étude a mis en évidence que TMEM16A est également surexprimée dans les CE-APs de patients atteints d'HTAPi et que la surexpression de TMEM16A dans les CE-APs contrôles, entrainait une diminution de la production de NO, de la prolifération, de la migration et de l'angiogenèse (Skofic Maurer et al. 2020).

CFTR est un membre de la famille des transporteurs ABC (ABCC7). Sa structure est proche des autres membres décrits précédemment (SUR1, SUR2B et SUR2A) avec deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 et deux domaines de liaison nucléotidiques (NBD1 et NBD2) et un domaine régulateur R. Le canal ionique CFTR se dimérise pour être fonctionnel. Le canal a une faible conductance (6-10pS) et est perméable à plusieurs anions (Br^-, Cl^-, I^-, F^-) ainsi qu'à plusieurs anions polyatomiques (HCO^{3-} , NO^{3-}...). Des mutations dans le gène *CFTR* sont responsables de la mucoviscidose.

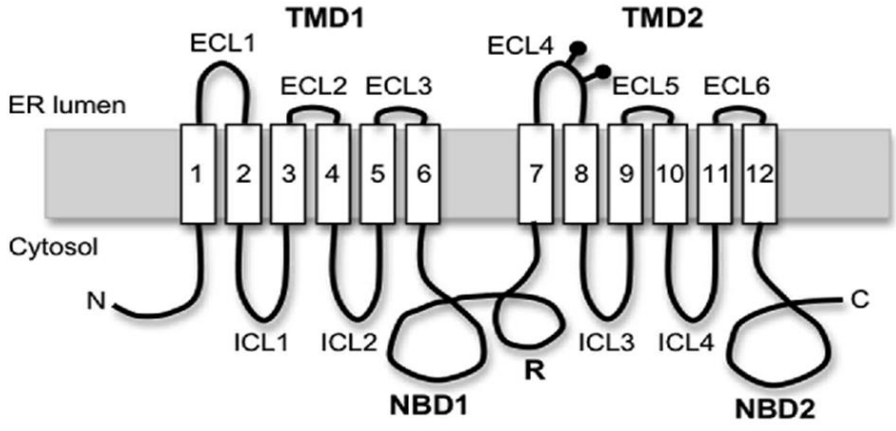


Figure 20 Schéma de la structure du canal CFTR

En 2007, Robert et al ont démontré que CFTR est exprimé dans les APs de rats et qu'il contribuait à la relaxation des APs indépendamment de l'endothélium(Robert et al. 2007). Il a également été démontré que CFTR est fonctionnel dans les CE-APs humaines (Totani et al.

2017). La prévalence du développement d'une HTAP chez des patients atteints de mucoviscidose est mal connue, mais certaines cohortes de patients atteints de mucoviscidose montrent que 60% des patients développent une HTP (Ratjen 2016). Une étude avait mis en évidence une diminution d'expression de CFTR dans les CML-APs de patients atteints d'HTAP comparés aux contrôles (Antigny et al. 2021; Papp et al. 2019). Récemment, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de CFTR au niveau des CML-APs et CE-APs humaines HTAP et dans deux modèles animaux d'HTP. De plus, l'activation de CFTR au niveau des APs humaines, de rats et de cochons entraine une vasodilatation qui est réduite chez les patients atteints d'HTAP et dans les modèles d'HTP induite par la monocrotaline ou hypoxie chronique chez le rat. Cela démontre l'implication de CFTR dans le tonus vasculaire pulmonaire. L'inhibition chronique *in vivo* de CFTR chez le rat a entrainé une augmentation significative des pressions systoliques dans le VD corrélé à une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires. Nous avons pu mettre en évidence un remodelage des APs médiées par une hypertrophie de la media et une fibrose intimale chez les patients atteints d'une mucoviscidose sévère (F508del-CFTR). De même, on retrouve une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires chez les rats F508desCftr homozygotes. Enfin, l'inhibition chronique de CFTR dans le modèle de rat HTP induit par la MCT a démontré une augmentation des pressions systoliques dans le VD comparé aux rats contrôles. Toute cette étude a permis d'établir que la dysfonction de CFTR au niveau des APs pouvait être impliquée dans le développement de l'HTAP (Le Ribeuz et al. 2021). De plus, une autre étude paru en meme temps, a démontré que la perte de fonction de CFTR avec un inhibiteur spécifique dans les CEs entraine une augmentation de l'autophagie et une dysfonction endothéliale conduisant à la mise en place d'un phénotype pro-inflammatoire (Declercq et al. 2021). Cette étude suggère donc que dans le contexte de l'HTAP, la perte de CFTR dans les CE-APs pourrait jouer un rôle dans la dysfonction endothéliale associée au développement de l'HTAP (Antigny et al. 2021). D'autre part une étude a mis en évidence que la perte de cftr chez la souris était associée a la diminution de la vasoconstriction pulmonaire liée a l'hypoxie et que les souris *cftr*$^{-/-}$ étaient protégés contre le développement de l'HTP hypoxique (Tabeling et al. 2015).

Ces résultats obtenus durant ma thèse ne seront pas plus détaillés par la suite, car il ne s'agit pas de mon sujet principal de thèse.

4. Génétique de l'HTAP

4.1. Tableau récapitulatif des mutations

À ce jour il existe une vingtaine de gènes considérés comme des gènes de prédisposition pour le développement de l'HTAP. Le tableau ci-dessous répertorie les gènes que l'on retrouve le plus mutés chez des patients atteints d'HTAP et qui font partie des gènes recherchés lors d'études de whole genome sequencing.

Gène	Nombre de mutations différentes	Mode de transmission	References
BMPR2	486	Autosomique dominant	(International PPH Consortium et al. 2000)
EIF2AK4	58	Autosomique récessif/ Autosomique dominant	(Eyries et al. 2014)
ACVRL1	54	Autosomique dominant	(R. E. Harrison et al. 2003)
TBX4	44	Autosomique dominant	(Kerstjens-Frederikse et al. 2013, 4)
GDF2/BMP9	30	Autosomique récessif/ Autosomique dominant	(G. Wang et al. 2016)
SOX17	24	Autosomique dominant	(N. Zhu, Welch, et al. 2018, 17)
ENG	16	Autosomique dominant	(Rachel E. Harrison et al. 2005)
KCNK3	18	Autosomique dominant	(Ma et al. 2013)(Le Ribeuz et al. 2020)
ABCC8	25	Autosomique dominant	(Bohnen et al. 2018; Lago-Docampo et al. 2020, 8)
ATP13A3	14	Autosomique dominant	(Barozzi et al. 2019; Gräf et al. 2018; Machado et al. 2021)
SMAD9	10	Autosomique dominant	(Shintani et al. 2009)
AQP1	5	Autosomique dominant	(Gräf et al. 2018)
G6PD	3	Autosomique dominant	(Kurdyukov et al. 2018)
CAV1	3	Autosomique dominant	(Austin et al. 2012)
BMP10	2	Autosomique dominant	(Eyries et al. 2019)
SMAD4	2	Autosomique dominant	(Nasim et al. 2011)
KDR	2	Autosomique dominant	(Eyries et al. 2020)
SMAD1	1	Autosomique dominant	(Nasim et al. 2011)

Tableau 2 Liste des gènes mutés connus dans l'HTAP

C'est en 2000 que les premières analyses génétiques ont permis d'identifier des mutations hétérozygotes dans des familles de patients HTAP pour le gène *BMPR2*. C'est avec cette première identification que l'on a pu relier une cause génétique à la pathologie de l'HTAP et créer ensuite un sous-groupe d'HTAP dit HTAP héritable (HTAPh). Les mutations du gène *BMPR2* sont la cause majoritaire des HTAPh (70-80%). Par la suite le séquençage chez les patients atteints d'HTAP de gènes de la famille de *BMPR2*, la superfamille du TGF-β (Figure 21), ont permis d'identifier d'autres mutations dans les gènes *ACVRL1* (*ALK1*), *ENG* (endoglin), *CAV1*, *SMAD1*, *SMAD4*, *SMAD9*, *GDF2* (BMP9) et *BMP10* faisant partie de cette famille (Morrell et al. 2019).

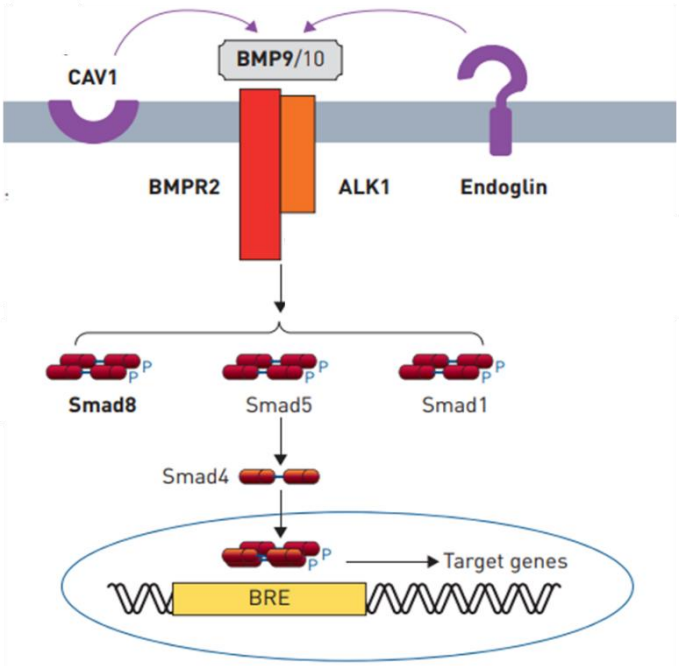


Figure 21 Voie de signalisation de BMPR2 et de ses gènes retrouvés mutés chez de patients HTAP d'après Morrell 2019

4.2. Mutations des canaux potassiques

4.2.1. KCNA5

Des SNPs (single nucleotide polymorphism) ont été mis en évidence dans le gène *KCNA5* codant pour Kv1.5 chez des patients atteints d'HTAP. En effet, Remillard et al. a identifié 17 SNP chez des patients atteints d'HTAP. 12 SNPs ont été identifiés dans la région 50 non traduite (UTR), 2 SNPs dans la région traduite de KCNA5, 2 SNPs dans la région 30 UTR, et 1 SNP en aval du gène KCNA5 (Remillard et al. 2007) Ces SNP sont localisés dans les régions promotrices et traduites de KCNA5, ce qui a fait suggérer à ces auteurs qu'ils devraient modifier l'expression de Kv1.5 (expression non testée)

Quatre autres SNPs ont été identifiés dans une cohorte de patients atteints d'HTAP associée à une sclérose systémique. Chez ces patients, le variant KCNA5 rs10744676 était associé à une protection contre l'HTAP (Wipff et al. 2010). Cependant, actuellement aucune étude fonctionnelle ni même d'expression ou localisation n'a été réalisée afin de déterminer la pertinence de ces SNPs. D'ailleurs, une étude récente de méta-analyse a conclu qu'il n'y a pas

de relation entre les SNPs de KCNA5 et le développement de l'HTAP (Jiao et al. 2019). De plus KCNA5 n'a pas été retrouvé associé à l'HTAP dans une grande cohorte européenne de meta-analyse de GWAS (genome wide association study) (Welch et Chung 2022). À l'heure actuelle ces variants de KCNKA5 ne sont pas considéré comme des mutations.

4.2.2. KCNK3

C'est en 2013 que les premières mutations dans le gène *KCNK3* ont été décrites. Six mutations hétérozygotes de *KCNK3* ont été identifiées dans des familles de patients atteints d'HTAP et d'HTAPi (Ma et al. 2013). Quatre ans plus tard, deux autres mutations de *KCNK3* ont été identifiées dans une cohorte espagnole de patients atteints d'HTAP. L'une des mutations (p.Gly106Arg) à l'état homozygote est associée à une forme précoce et agressive d'HTAP (Navas Tejedor et al. 2017). Best et al. ont identifié deux autres mutations (Best et al. 2017). En 2018, une étude de « whole genomic sequencing », réalisée sur 1048 patients atteints d'HTAP, a identifié 4 nouvelles mutations de *KCNK3* (R51L, A114T, E182Q, G236A). De la même manière le séquençage d'une cohorte de patients atteints d'HTAP pédiatrique a mis en évidence en 2018, 3 mutations *KCNK3* dont une (E182K) déjà décrite précédemment (N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018), et deux autres mutations ont été identifiées dans une autre cohorte chinoise de patients atteints d'HTAP pédiatrique (A114V et G97R)(H.-S. Zhang et al. 2019). En 2020, une nouvelle mutation de *KCNK3* a été identifiée dans une cohorte nationale néerlandaise d'enfants atteints d'HTAP (Haarman et al. 2020). À ce jour, 18 mutations différentes de *KCNK3* ont été identifiées chez 26 patients (Tableau 3). Il a été mis en évidence 3 porteurs sains de mutations *KCNK3* (tableau 2). Avec les données existantes publiées, la pénétrance des mutations *KCNK3* semble être de 90%. Parmi ces patients mutés pour *KCNK3*, il y a 11 femmes et 7 hommes, ce qui veut dire que 60% des patients HTAP mutés pour *KCNK3* sont des femmes.

Comme l'illustre la figure 22, une mutation est située sur la première boucle cytoplasmique, une sur la deuxième boucle cytoplasmique, trois sur le premier domaine pore, deux dans le deuxième domaine transmembranaire, huit sur le deuxième domaine pore et trois dans le quatrième domaine transmembranaire (figure 22).

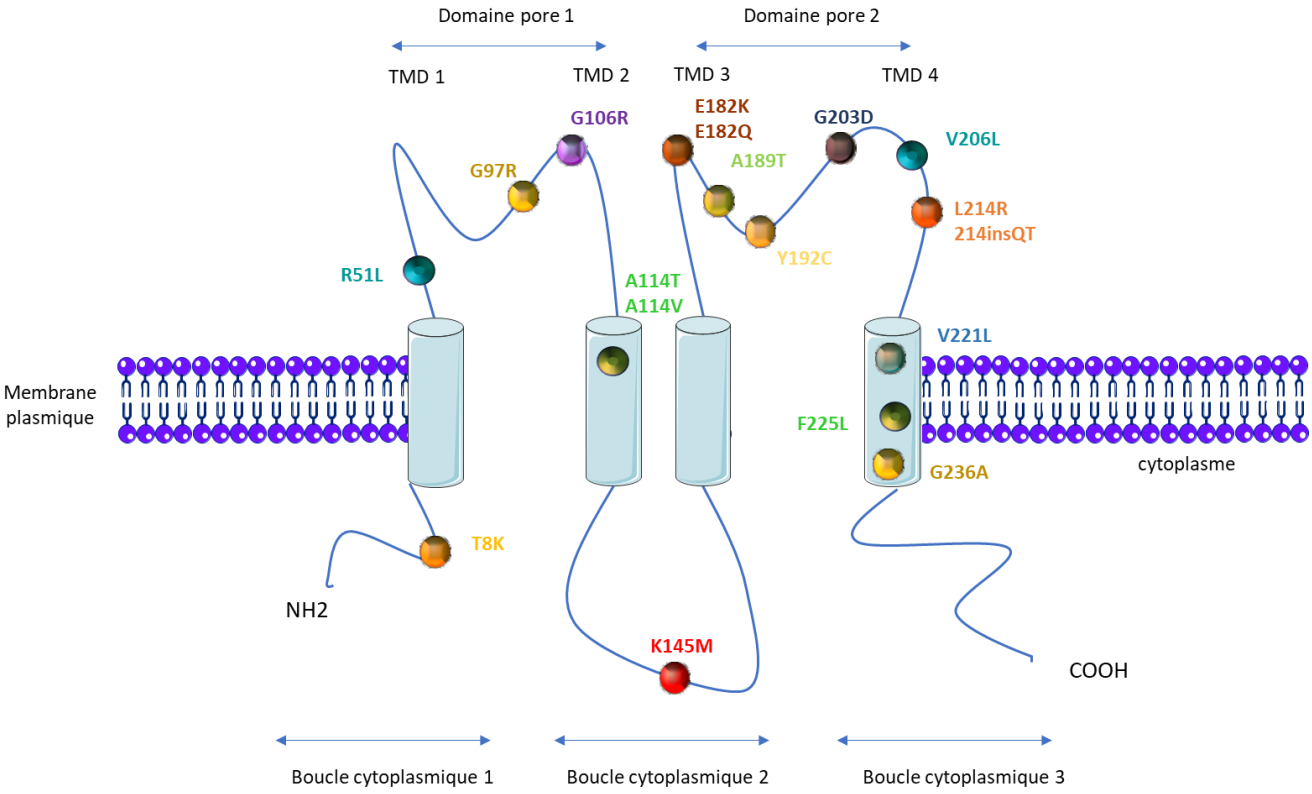


Figure 22 Schéma représentatif de la localisation des mutations sur la protéine KCNK3/TASK-1

Les patients atteints d'HTAP porteurs de mutations de *KCNK3* sont plus jeunes au moment du diagnostic (âge médian de 28 ans contre 42 ans pour les patients atteints d'HTAPi), et leur PAPm est plus élevée (76 mmHg contre 56,4 mmHg pour les patients atteints d'HTAPi) (Evans et al. 2016; Le Ribeuz, et al. 2020).

Mutation KCNK3 (acides aminés)	Mutation KCNK3 (acides nucléiques)	Nombre de patients HTAP porteurs de la mutation	Nombre de porteur sains	Zygosité	Fonction (patch clamp)	Fonction retrouvée par le ONO-RS-082	ACMG Classification	References
T8K		1		Hétérozygote	perte de fonction	oui		(Ma et al. 2013)
R51L	152G>T	1			/	/		(Gräf et al. 2018)
G97R	289 G>A	2	1	Hétérozygote	perte de fonction	/		(Ma et al. 2013; H.-S. Zhang et al. 2019)
G106R	316 G>C	2	1	Hétérozygote et homozygote	perte de fonction	non		(Navas Tejedor et al. 2017)
A114T	340G>A	1			/	/		(Gräf et al. 2018)
A114V	341C>T	1		Hétérozygote	/	/		(H.-S. Zhang et al. 2019)
K145M	434 À>T	1		Hétérozygote	/	/		(Best et al. 2017)
E182K	544G>A	2		Hétérozygote	perte de fonction	oui	pathogénique	(Ma et al. 2013; N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018)
E182Q	544G>C	1			/	/		(Gräf et al. 2018)
A189T	565 G>A	1		Hétérozygote	/	/		(Best et al. 2017)
Y192C		1		Hétérozygote	perte de fonction	/		(Ma et al. 2013)
G203D	608 G>A	6	1	Hétérozygote	perte de fonction	non		(Higasa et al. 2017; Ma et al. 2013)
V206L	616 G>T	1		Hétérozygote	/	/		(Haarman et al. 2020)
L214R	641 T>G	1		Hétérozygote	perte de fonction	non		(Navas Tejedor et al. 2017)
214insQT	641_642insGCAGAC	1		Hétérozygote	/	/	signification incertaine	(N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018)
V221L	661 G>C	1		Hétérozygote	perte de fonction	/		(Ma et al. 2013)
F225L	675C>A	1		Hétérozygote	/	/	signification incertaine	(N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018)
G236A	707G>C	1		Hétérozygote	/	/		(Gräf et al. 2018)

Tableau 3 Tableau des mutations du gène *KCNK3* retrouvées chez des patients HTAP

Les conséquences des mutations de *KCNK3* sur la fonction du canal ont été mesurées par des expériences de patch-clamp en configuration cellule entière, dans des cellules sur exprimant chaque canal *KCNK3* muté (Tableau 2). Comme l'indique le tableau 2, les huit (8/16) mutations analysées (T8K, G97R, G106R, E182K, Y192C, G203D, L214R et V221L) entraînent une perte de fonction de KCNK3/TASK-1. À ce jour, les mutations A114V, K145M, V206L et A189T n'ont pas été évaluées [24,50,54,57]. En outre, l'application de ONO-RS-082, qui est un inhibiteur de la phospholipase A2 dont il a été démontré qu'il active le canal KCNK3/TASK1 (Feinmark et Robinson 2012), rétablit la fonction des mutants T8K, E182K et V221L au même niveau que le canal non muté dans des conditions basales, tandis que les mutations G203D, G106R et L214R sont insensibles à l'ONO-RS-082 (Bohnen et al. 2017; Ma et al. 2013). Pour la mutation V221L, le courant KCNK3/TASK-1 n'est restauré par l'ONO-RS-082 qu'à un pH extracellulaire de 8,3.

Cependant les conséquences de la perte de fonction de KCNK3 sur les voies de signalisation et sur la physiologie des cellules vasculaires pulmonaires (CML-APs et CE-APs) sont actuellement peu connues. C'est pour cela que je me suis intéressée à cet aspect au cours de ma thèse (voir exposé des travaux).

4.2.3. ABCC8

En 2018 des analyses de whole exome sequencing ont mis en évidence un variant d'*ABCC8* (R957H) chez un patient pédiatrique HTAPi. Ce gène n'avait pas encore été mis en évidence comme étant impliqué dans l'HTAP. Cette étude a permis de l'indiquer comme nouveau gène prédisposant à l'HTAP et ce variant était classé *in sillico* comme délétère (N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018).

Egalement en 2018, un whole exome sequencing de patients atteints d'HTAP a permis de découvrir 12 mutations hétérozygotes différentes dans le gène *ABCC8*, qui code pour SUR1 [79]. 11 mutations faux-sens et un variant d'épissage ont été identifiés chez ces patients atteints d'HTAP.

Les patients atteints d'HTAP porteurs de la mutation *ABCC8* sont plus jeunes au moment du diagnostic (14 ans contre 42 ans pour les patients atteints d'HTAPi), mais ont une PAPm similaire à celle des patients atteints d'HTAPi (47,6 mmHg pour les patients porteurs de la mutation *ABCC8* et 56,4 mmHg pour les patients atteints d'HTAPi) (Bohnen et al. 2018). Ces mutations sont localisées au niveau d'acides aminés bien conservés entre les espèces et

localisés dans des régions cruciales de la protéine (cinq dans les boucles 1 et 2 du NBD (nucleotide binding domain), deux dans la boucle du cytoplasme et quatre dans le TMD0 (domaine transmembranaire 0) (Figure 23). En 2020 une nouvelle mutation hétérozygote dans *ABCC8* a été identifiée chez un patient atteint d'HTAP pédiatrique de 19 mois (V357I) (Gelinas et al. 2020).

En 2020, 11 rares variants *ABCC8* ont été mis en évidence dans une cohorte espagnole de 624 patients atteints d'HTAP (579 adultes et 45 pédiatriques). Ces 11 variants ont été retrouvés dans cette cohorte avec un âge moyen au diagnostic de 34±10 ans et 54% de femmes. Un des variants (E100K) a été retrouvé chez un patient diagnostiqué pour une MVOP. 2 variants sont situés dans le TMD0, 2 dans le TMD1, 3 sont situés dans le NBD1, 2 dans le TMD2 et 1 dans le NBD2. De plus, un des variants se situe dans un intron au niveau d'une boucle cytoplasmique du TMD2 (c.2694+1G>A)(Lago-Docampo et al. 2020). Les auteurs ont réalisé une étude *in sillico* pour prédire la pathogénicité de ces variants et la majorité (8/11) a été identifiée comme probablement pathogéniques (Tableau 4)

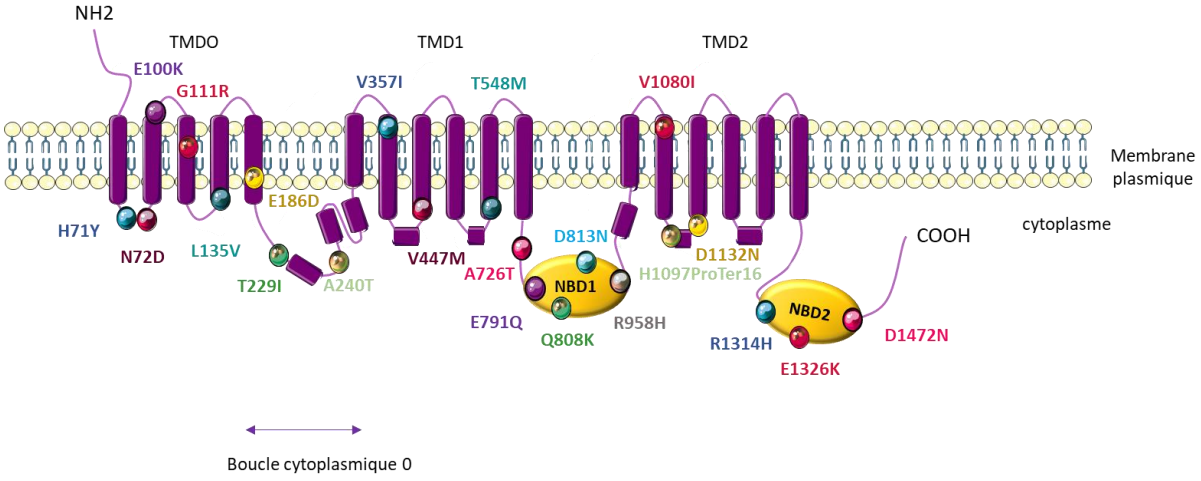


Figure 23 Schéma représentatif de la localisation des mutations sur la protéine SUR1

Les patients atteints d'HTAP présentant une mutation *ABCC8* ne sont généralement pas porteurs d'autres mutations génétiques sauf le cas d'un patient, également porteur d'une mutation *TBX4* et qui a développé une HTAP à un stade très précoce (<1 an). De plus, l'un des patients de la cohorte espagnole (H71Y) est également porteur d'une mutation *SMAD1* classée comme étant probablement pathogénique.

Par des expériences de patch-clamp et des mesures d'efflux de rubidium ($86Rb^+$) dans des cellules surexprimant chaque mutation de SUR1 + WT-Kir6.2, Bohnen et al. ont montré que 11 des 12 mutations, identifiées dans leurs cohortes conduisaient à une forte diminution du courant SUR1/Kir6.2. Grâce aux mesures d'efflux de tests $86Rb^+$ en conditions métaboliques basales et inhibées, ils ont montré une diminution significative de l'activité SUR1/Kir6.2 pour trois mutants SUR1 en conditions basales (A240T, D813N, et D1472N) et une diminution significative de l'activité SUR1/Kir6.2 en conditions métaboliques inhibées pour cinq mutations (L135V, A240T, D813N, R958H, et D1472N). Dans l'ensemble (patch-clamp et efflux Rb^+), ces résultats indiquent une diminution significative de l'activité basale ou maximale du canal pour tous les mutants SUR1 testés. Il est important de noter que la fonction de L135V, E186D, A240T, E791Q, D813N, R958H, R1314H, et D1472N est restaurée en présence de diazoxide (100 µM) (Tableau 3)(Bohnen et al. 2018).

Sept de ces variants *ABCC8* (p.G111R, p.L135V,p.A726T ,p.D813N, p.E1326K, p.D1472N et c.2694+1G>A) ont également été décrits chez des patients atteints d'hyperinsulinisme congénital, et deux autres variants (p.T229I et p.R1314H) ont été décrits chez des patients atteints de diabète néonatal. Enfin le variant E100K a été décrit précédemment chez des patients atteints de diabète de type MODY (maturity onset diabetes of the young). Cependant, ces patients atteints d'HTAP porteurs de ces mutations *ABCC8* rares n'ont pas développé l'une des pathologies décrites ci-dessus.

Il est bien connu que le diabète induit un dysfonctionnement endothélial au niveau des vaisseaux systémiques et que les patients diabétiques ont un risque plus élevé de développer un infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral. Cependant, l'effet du diabète sur la circulation pulmonaire n'est pas clair. Reza Movahed et al. ont démontré que les patients atteints de diabète sucré ont une prévalence plus élevée d'embolie pulmonaire et d'hypertension pulmonaire (Movahed, Hashemzadeh, et Jamal 2005). D'après le registre REVEAL, le diabète est une comorbidité courante chez les patients américains atteints d'HTP (Lang et Palazzini 2019). De plus, la survie à long terme des patients diabétiques atteints d'HTAP est plus mauvaise que celle des patients non diabétiques (Abernethy et al. 2015).

Mutation *ABCC8* (AA)	Mutation *ABCC8* (nucleic acid)	Nombre de patients HTAP porteurs de la mutation	Zygosité	Fonction		Fonction restaurée par le diazoxide	ACMG Classification	References
				(patch clamp)	(Rubidium ($86Rb^+$) efflux assays			
H71Y	211C>T	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
N72D	214 À>G	1	Hétérozygote	/	/	/		(Bohnen et al. 2018)
E100K	298G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	signification incertaine	(Lago-Docampo et al. 2020)
G111R	331 G>A	1	Hétérozygote	/	/	/		(Bohnen et al. 2018)
L135V	403 C>G	1	Hétérozygote	perte de fonction	baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
E186D	558 G>T	1	Hétérozygote	perte de fonction	pas de baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
T229I	686 C>T	1	Hétérozygote	/	/	/		(Bohnen et al. 2018)
A240T	718 G>A	1	Hétérozygote	perte de fonction	baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
V357I	1069G>A	1	Hétérozygote	/	/	/		(Gelinas et al. 2020)
V477M	1429G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
T548M	1643C>T	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
A726T	2176G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	signification incertaine	(Lago-Docampo et al. 2020)
E791Q	2371 G>C	1	Hétérozygote	perte de fonction	petite baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
Q808K	2422C>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
D813N	2437 G>A	1	Hétérozygote	perte de fonction	baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
/	2694+1G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
/	2694 T>2G	1	Hétérozygote	/	/	/		(Bohnen et al. 2018)
R957H	2870G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Pathogène	(N. Zhu, Gonzaga-Jauregui, et al. 2018)
R958H	2873 G>A	1	Hétérozygote	pas de perte de fonction	baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
V1080I	3238G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	signification incertaine	(Lago-Docampo et al. 2020)
H1097ProfsTer16	3288_3289del	1	Hétérozygote	/	/	/	Pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
D1132N	3394G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
R1314H	3941 G>A	1	Hétérozygote	perte de fonction	petite baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)
E1326K	3976G>A	1	Hétérozygote	/	/	/	Probablement pathogène	(Lago-Docampo et al. 2020)
D1472N	4414 G>A	1	Hétérozygote	perte de fonction	baisse	oui		(Bohnen et al. 2018)

Tableau 4 Tableau des mutations dans le gène *ABCC8* retrouvées chez des patients HTAP

Cependant l'expression et la fonction de SUR1/Kir6.2 dans la circulation pulmonaire ne sont actuellement pas connues. Je me suis intéressé au rôle de ce canal dans le développement de l'HTAP au cours de ma thèse (voir exposé des travaux).

4.2.4. ABCC9

Des mutations du gène *ABCC9* codant pour les protéines SUR2A ou SUR2B sont la principale cause du Syndrome de Cantu. Des mutations dans le gène *KCNJ8* codant pour Kir6.1 ont également été décrites comme associées à cette pathologie (Cooper et al. 2014; Harakalova et al. 2012). Ce sont des mutations gain de fonction.

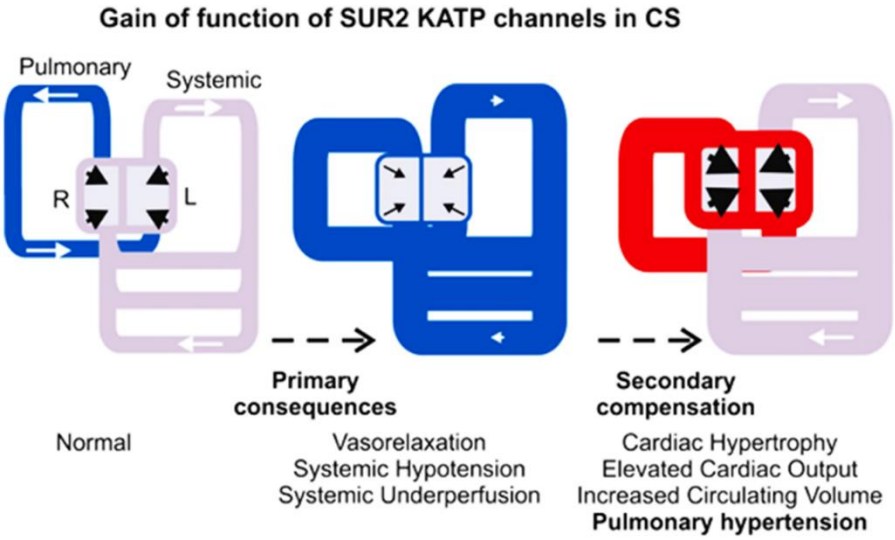


Figure 24 Schéma représentant l'hypothèse des mécanismes à l'origine de l'HTP survenu dans le syndrome de Cantu (McClenaghan et al. 2019)

Le syndrome de Cantu se caractérise par une hypertrichose congénitale, une ostéochondroplasie et des anomalies cardiaques telles qu'une cardiomégalie, un système vasculaire dilaté et tortueux et un épanchement péricardique. Secondairement à toutes ces anomalies certains patients peuvent développer une HTP (Harakalova et al. 2012). Ces patients développant une HTP peuvent être catégorisés dans le groupe 2 des HTP correspondant aux dysfonctions du cœur gauche. Des souris ont été génétiquement modifiées par CRISPR/Cas9 en introduisant dans les gènes *ABCC9* et *KCNJ8* murins la mutation gain de fonction. La caractérisation de ces souris a mis en évidence un phénotype proche du syndrome de Cantu humain, avec une circulation systémique à faible débit liée à une dilatation vasculaire et une hypertrophie cardiaque. L'hypothèse des mécanismes à l'origine de la mise en place d'une HTP chez les patients atteints du syndrome de Cantu serait que ce gain de fonction du KATP SUR2/Kir6.1 dans le système vasculaire systémique entraine une relaxation des artères systémiques, ce qui entraine une hypotension. Cette hypotension systémique entraine une hypertrophie cardiaque et une augmentation du débit cardiaque et cela peut alors entrainer secondairement une hypertension pulmonaire.

Cependant l'expression, la fonction de SUR2/Kir6.1 dans la circulation pulmonaire n'est actuellement pas connue et le rôle que ce canal peut jouer dans la physiopathologie de l'HTAP n'a pas été étudié. C'est pourquoi je me suis intéressée au rôle de ce canal dans le développement de l'HTAP au cours de ma thèse (Voir exposé des travaux)

4.3. Nouvelles mutations

Plus récemment, d'autres gènes prédisposant à l'HTAP ont pu être identifiés comme étant mutés chez certains patients atteints d'HTAP. Néanmoins, leur réelle implication dans la pathologie reste à être élucidée. Ils ont pour le moment un statut de gène candidat. C'est le cas des gènes *EDNRA* et *AGTR1*, des récepteurs à l'endothéline et l'angiotensine, des facteurs vasoconstricteurs, *NOTCH3* un gène impliqué dans le développement, et notamment le développement des poumons comme *TBX4* et *SOX17*. *TRPC6* et *EFCAB4B*, impliqués dans la signalisation calcique ou encore *NOS2* impliqué dans la synthèse du NO (Barozzi et al. 2019; Garcia-Rivas et al. 2017).

5. Physiopathologie de l'HTAP

5.1. Histopathologie des lésions vasculaires

Plusieurs lésions tissulaires sont régulièrement retrouvées chez les patients atteints d'HTAP et sont caractéristiques de la maladie.

5.1.1. Lésions de l'intima

La fibrose intimale est une lésion fréquente dans l'HTAP. Elle se caractérise par le recrutement de fibroblastes, myofibroblastes qui vont entrainer le dépôt de collagène au niveau de l'intima. Cet épaississement de l'intima peut-être uniforme et concentrique ou bien excentrique ce qui entraine l'apparition de lésions thrombotiques. Les lésions concentriques que l'on peut qualifier de « couches d'oignons » participent à l'occlusion de la lumière des petites artères (100-200µm) (Montani et al. 2013). Une autre caractéristique des lésions intimales est l'hypothèse d'une apoptose des CEs dans les premières étapes de développement de l'HTAP. Les CEs restantes vont acquérir un phénotype pro-prolifératif et de résistance à l'apoptose (Sakao, Tatsumi, et Voelkel 2009). Enfin un processus décrit dans l'HTAP est le switch phénotypique des CEs d'un état endothélial à un phénotype mésenchymal ou myofibroblastique (Ranchoux et al. 2015). Ces phénomènes s'accompagnent souvent d'une infiltration de cellules inflammatoires. L'ensemble de ces processus participe à ce qu'on appelle la formation d'une lésion néo-intimale et de la fibrose intimale (Figure 25).

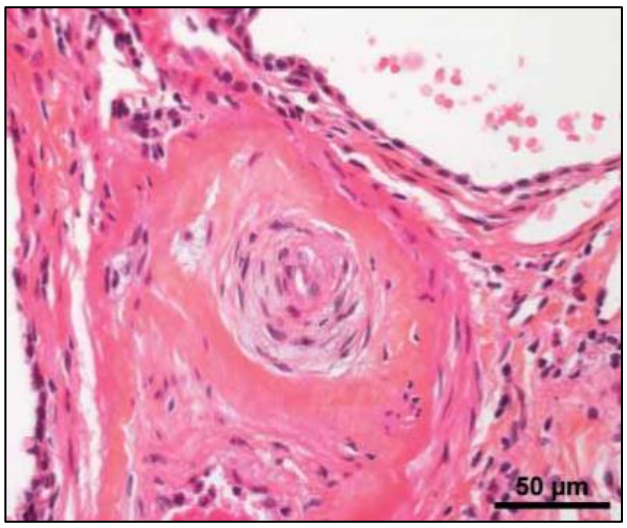


Figure 25 Coloration HES d'une lésion intimale d'une artériole pulmonaire

5.1.2. Hypertrophie de la media

Ce qui est observé dans toutes les formes d'HTAP et constitue caractéristique importante de la maladie est la muscularisation des petites artérioles (50-100µm) qui ne sont pas ou peu muscularisées chez un sujet sain (Figure 26). On retrouve également une hypertrophie de la media des artérioles musculaires (100-500µm) due à une prolifération anormale et une résistance à l'apoptose des CML-APs. Cela a pour conséquence de réduire la lumière APs et donc d'augmenter les RVP et la PAPm.

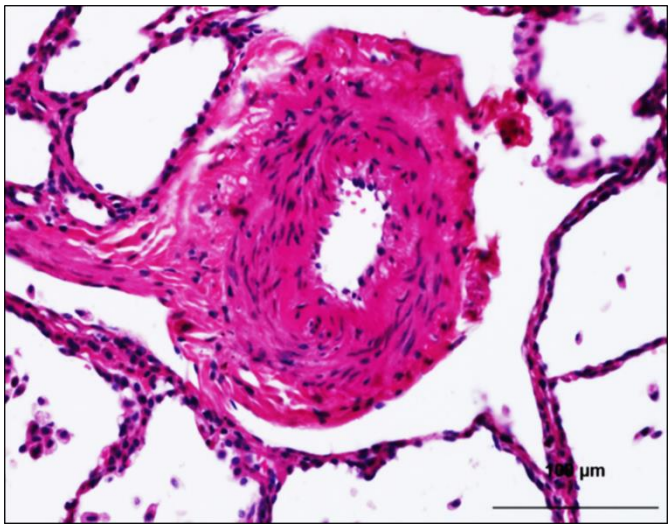


Figure 26 Coloration HES montrant l'hypertrophie de la média

5.1.3. Lésions pléxiformes

Ces lésions complexes se forment préférentiellement au niveau d'embranchement d'artérioles et se forment majoritairement par des CEs avec un phénotype prolifératif exacerbé. Cela entraine la formation de petits capillaires pulmonaires en parallèle de l'artériole obstruée. Ces lésions peuvent être formées également par des CML-APs et une matrice extracellulaire très riche en collagène (Figure 27). La formation de ces lésions est souvent corrélée avec la sévérité de l'HTAP (Pietra et al. 2004).

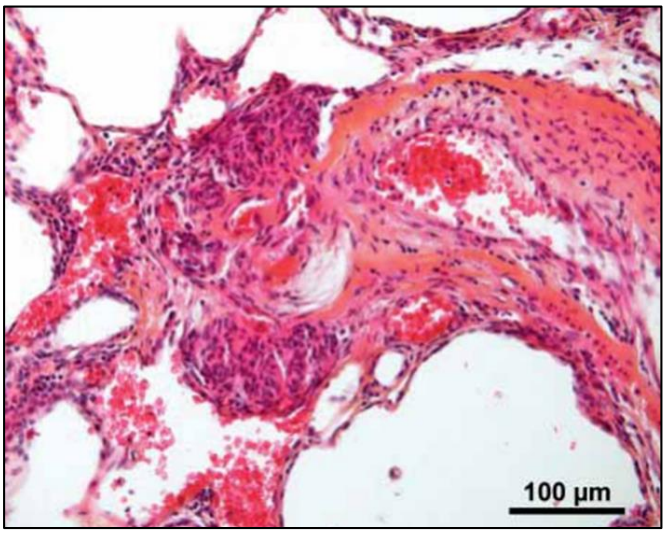


Figure 27 Coloration HES d'une lésion plexiforme

5.2. Dérégulations cellulaires

5.2.1. Dysfonction endothéliale

Les CEs jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des vaisseaux sanguins. Elles sont une barrière entre le sang et le vaisseau et jouent le rôle de filtre moléculaire. Elles permettent également le maintien de la coagulation sanguine. L'endothélium peut également contrôler la vasomotricité des vaisseaux en sécrétant des facteurs vasodilatateurs ou vasoconstricteurs en réponse à des stimuli chimiques (neurotransmetteurs, cytokines, dérivés oxygénés) ou mécaniques (force de cisaillement du flux sanguin : Shear stress).

Durant le développement de l'HTAP, l'endothélium va être soumis à une augmentation de la fréquence de ces stimuli par exemple l'augmentation des pressions sanguines et des contraintes de cisaillement, l'apparition d'infections et d'une réponse inflammatoire (HIV), ou encore l'hypoxie, ou des facteurs génétiques de prédisposition. Cet ensemble va entrainer le passage des CEs d'un état quiescent et stable à une état « activé » qui va se caractériser par la sécrétion excessive de facteurs vasoconstricteurs, pro-prolifératifs, pro-inflammatoire et thrombotiques (Budhiraja, Tuder, et Hassoun 2004).

Un déséquilibre va s'initier entre la diminution de facteurs vasodilatateurs tels que le NO, la prostacycline et l'EDHF et d'autre part une surproduction de facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1, le thromboxane A2 et l'angiotensine. Ce déséquilibre va avoir pour conséquence d'induire une vasoconstriction anormale des CML-APs. De plus, plusieurs facteurs de croissance sécrétés par les CE-APs ont été retrouvés dérégulés dans l'HTAP tels que le PDGF (platelet-derived growth factor), le FGF2 (fibroblast growth factor 2) et le VEGF (vascular endothélial growth factor). L'expression de facteurs de transcription Hif1-α (hypoxia induced factor 1-α) et HIMF (hypoxia indcued mitpgenic factor)(Johns et al. 2016) ainsi que la sécrétion anormale de molécules inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-1β (Interleukine-6 et interleukine-1β), le TNF-α (tumour necrosis factor-α) et le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (T. Itoh et al. 2006; Soon et al. 2010; Steiner et al. 2009).

Une des composantes de cette dysfonction endothéliale dans l'HTAP est la transition endothélio-mésenchymateuse (endoMT)(Figure 28). Ce processus implique la perte progressive des marqueurs endothéliaux (VE-cadherine, PECAM-1 ou CD31...) ce qui correspond à une perte d'adhésion des CEs, ce qui entraine leur migration. En contrepartie, ces CEs en transition endoMT vont produire du collagène de type 1 et des élastines ainsi que des marqueurs myofibroblastiques comme l'α-SMA et le FSP-1 (fibroblast specific protein-1).

L'expression de facteurs d'initiation va promouvoir cette transition, comme le TGF-β, HIF1α ou FGF. Des facteurs de transcriptions promésenchymateux vont alors être exprimés comme twist-1, snail1 et slug ce qui va permettre aux cellules endoMT de produire des marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et N-cadherine, ce qui participe à l'acquisition pour les cellules d'un état pro migratoire et pro-prolifératif.

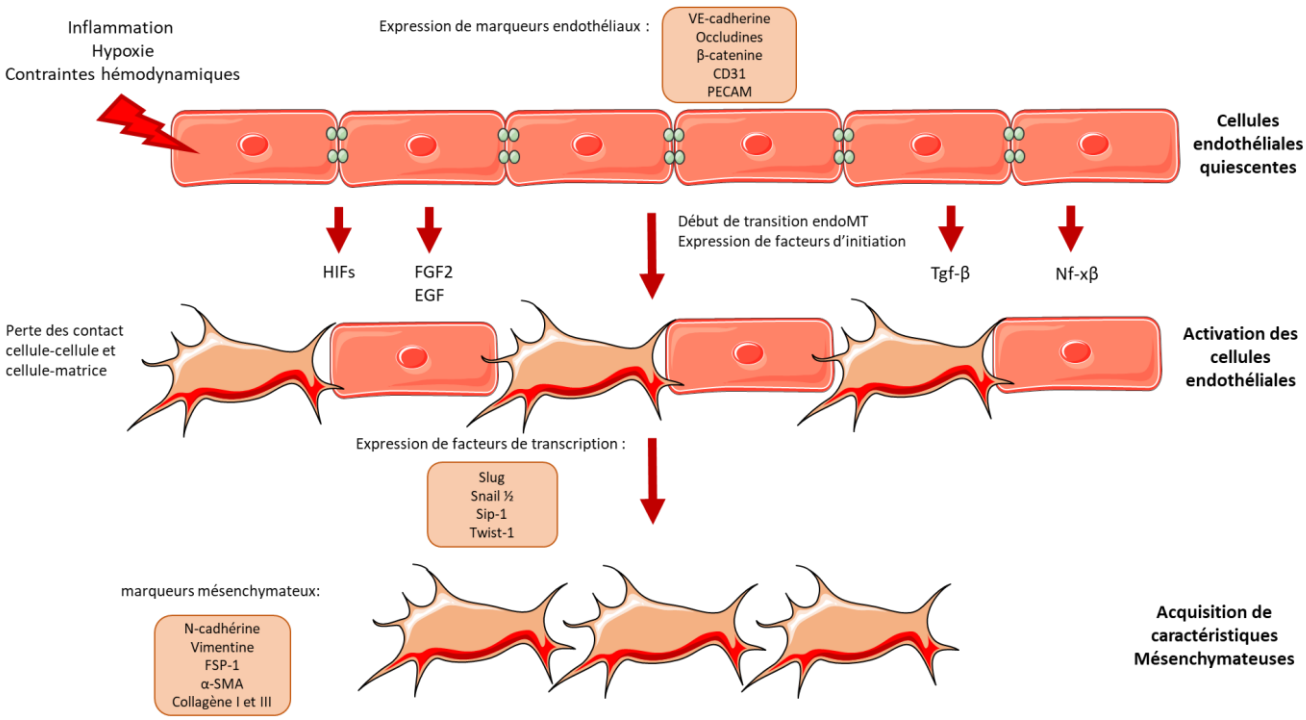


Figure 28 Mécanismes impliqués dans la transition endothelio-mesenchymateuse (D'après Stenmark et al, 2016)

5.2.2. Dysfonction des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CML-APs)

Les CML-APs en conditions normales sont des cellules quiescentes la plupart du temps, non migratoires, non proliférantes et qui exercent leur fonction contractile, ce qui est considéré comme leur état différencié. Cependant, cet état différencié peut évoluer comme chez toutes les CMLs en réponse à des changements dans leur environnement (stress, inflammation, sécrétion de facteurs...). Les CMLs changent alors leur phénotype de manière plus ou moins réversible en s'adaptant aux nouvelles contraintes (Tajsic et Morrell 2011).

Dans le contexte de l'HTAP, le paradigme actuel atteste d'une dysfonction endothéliale en premier lieu, qui mène à la dérégulation de facteurs vasoactifs, de croissance, thrombotique ou inflammatoire. Ces facteurs accèdent facilement à la média avec la perte de l'intégrité de

la barrière endothéliale et vont cibler les CML-APs. La sécrétion de ces facteurs va entrainer leur changement phénotypique vers un phénotype synthétique ou prolifératif caractérisé par une hypertrophie des CMLs, par l'augmentation de la production de protéines et l'inhibition de leur dégradation ainsi que l'augmentation de l'expression de co-transporteurs ioniques (Na^+/K^+-ATPase) ce qui joue directement sur la régulation de la quantité d'eau dans la cellule et donc sur son volume (Krug et Berk 1992). La dérégulation de la balance prolifération-apoptose représente un marqueur majeur de la dérégulation des CML-APs au cours de l'HTAP. Enfin la migration des CML-APs est également dérégulée (Paulin et al. 2014)(Figure 29).

Les mutations du gène *BMPR2* chez les patients atteints d'HTAPh jouent aussi un rôle dans la dérégulation des CML-APs. En effet, la perte de fonction de la protéine BMPRII induit un déséquilibre de la balance de la voie BMP/TGF-β en faveur du facteur de croissance TGF-β qui va activer la voie des MAPkinases et favoriser la prolifération des CML-APs (Tielemans et al. 2019).

La perte d'expression et de fonction de plusieurs canaux potassiques comme KCNK3/TASK-1 et Kv1.5 est également un déclencheur de la dysfonction des CML-APs au cours de l'HTAP (Le Ribeuz et al. 2020). Cette perte de fonction entraine la dépolarisation des membranes des cellules qui a pour conséquence première l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ qui va favoriser plusieurs processus comme la contraction des cellules, leur prolifération, leur migration. Le K^+ a aussi été décrit pour être impliqué dans les étapes d'apoptose des CML-APs. Tout d'abord la première étape de diminution du volume cellulaire (apoptotic volume decrease) est favorisée par l'ouverture des canaux K^+ qui vont favoriser la sortie d'H_20 de la cellule. De plus il a été démontré qu'en conditions physiologiques la $[K^+]_i$ ne permet pas l'activation des caspases et donc la formation de l'apoptosome. Cela implique qu'une diminution de $[K^+]_i$ par un efflux de K^+ favorise l'apoptose par l'activation des caspases. Ce processus est alors inhibé lorsqu'il y a perte de fonction des canaux K^+ comme dans l'HTAP (Burg, Remillard, et Yuan 2008; Cain et al. 2001).

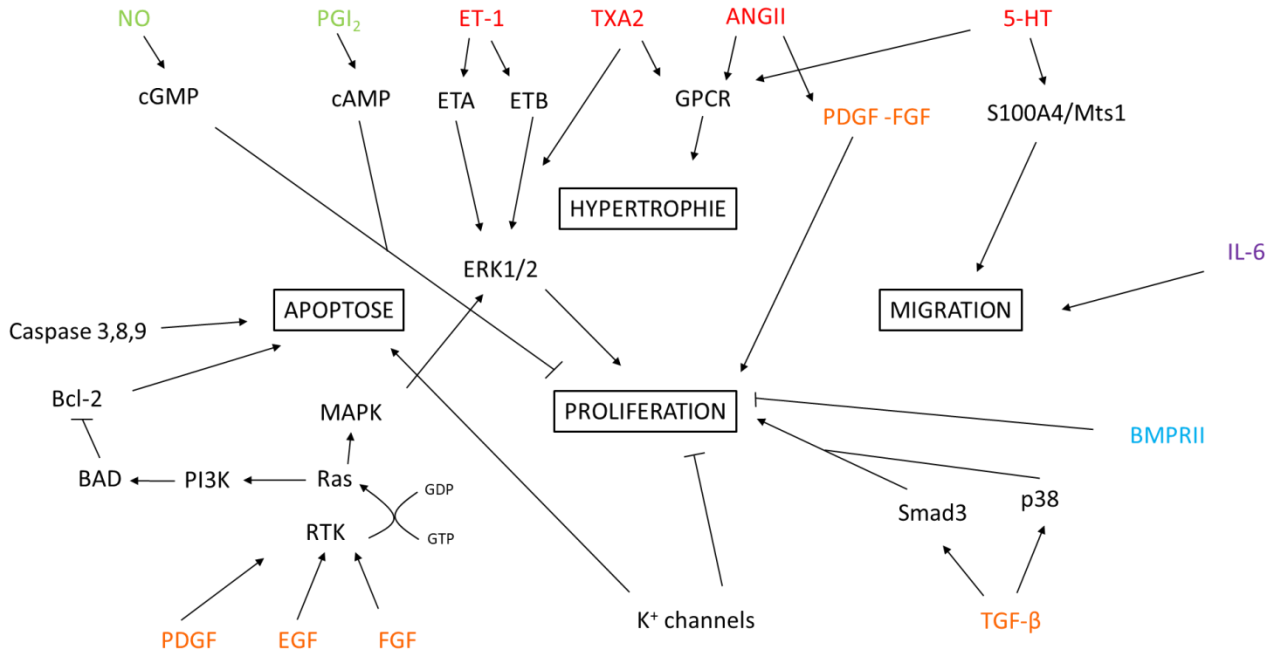


Figure 29 Mécanismes impliqués dans la régulation des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires au cours de l'HTAP (D'après Tajsic et al 2011)

5.2.3. Dysfonction des fibroblastes

Les fibroblastes sont présents au niveau de l'adventice des APs. L'adventice est formée de tissus conjonctifs contenant des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des cellules immunitaires et des prolongements nerveux. Le rôle des fibroblastes au sein de l'adventice est multiple. Le premier et principal est la régulation de la matrice extracellulaire et notamment la production de collagène. Les fibroblastes sont aussi en interaction avec plusieurs acteurs comme les autres cellules vasculaires (CML et CE), mais aussi avec les cellules neurales et les cellules immunitaires qui composent l'adventice. C'est pour cela que l'on appelle parfois les fibroblastes les cellules sentinelles (Stenmark et al. 2013). Les fibroblastes adventitiels sont sensibles à des changements environnementaux comme l'hypoxie, l'inflammation ou des forces mécaniques. Ces stimuli activent les fibroblastes qui peuvent se dédifférencier en myofibroblastes. Cette dédifférenciation est notamment observée dans le modèle d'HTP induit par l'hypoxie chronique et est régulée par plusieurs facteurs tels que des facteurs de croissance, des cytokines et des molécules de la matrice extracellulaire (TGF-β, endotheline-1, IL-6, Fizz1...) qui sont connus pour être dérégulés dans l'HTAP (Malmström et al. 2004; Shi-Wen et al. 2004). D'autres études ont montré que les fibroblastes en condition d'hypoxie acquièrent un phénotype prolifératif, migratoire et de différenciation notamment

par l'activation de la voie PI3K/Akt (Chai et al. 2018). Plus récemment une étude a démontré l'implication du canal TRPV4, un canal perméable au calcium dans l'activation des fibroblastes et le remodelage adventitiel dans l'HTP (Cussac et al. 2020).

5.2.4. Dysfonction d'autres types cellulaires

5.2.4.1. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules connues pour avoir un rôle majeur dans la régulation du développement vasculaire et sont situées à une position stratégique dans le vaisseau, à l'interface entre la lumière des vaisseaux et les espaces interstitiels, ils sont en contact proche avec les CEs et CMLs. Ces cellules possèdent également une capacité de différenciation en plusieurs lignées cellulaires.

Il a été démontré qu'il y a une augmentation de la densité pericytaire au niveau des APs distales de patients atteints d'HTAP. De plus, il a été observé *in vitro* que les pericytes en présence de surnageant de culture de CE-APs de patients atteints d'HTAP ont une prolifération et migration plus importante que les péricytes cultivés avec du surnageant de culture de CE-APs contrôles. Cette augmentation de péricytes dans le tissu pulmonaire HTAP joue un rôle dans le remodelage pulmonaire notamment par leur capacité de différenciation en CML (Ricard et al. 2014).

De plus, l'augmentation du nombre de péricytes dans les modèles animaux tels que le modèle MCT ou d'hypoxie chronique a été mise en évidence ainsi que leur implication dans le remodelage vasculaire pulmonaire (Bordenave et al. 2020).

5.2.4.2. Cellules endothéliales progénitrices (EPC)

Ces cellules progénitrices proviennent de la moelle osseuse et migrent jusqu'aux vaisseaux sanguins pour se différencier en CE-APs, ces cellules portent des marqueurs endothéliaux tels que CD34 et VEGFR-2. Il a été trouvé que le nombre de ces cellules est augmenté chez les patients atteints d'HTAP est que cette augmentation est proportionnelle à la sévérité de la maladie (Dierick et al. 2021; Toshner et al. 2009). De même que les taux de EPC sont augmentés, le taux de microparticules (<1µm) de différents types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les plaquettes et les leucocytes ont été retrouvés augmentés dans le plasma de patients HTAP (Nadaud et al. 2013).

5.2.4.3. Cellules progénitrices des cellules musculaires lisses (SPF)

Plusieurs populations de cellules progénitrices ont été reconnues pour pouvoir se différencier ou dédifférencier en cellules musculaires lisses, α-SMA positives (Dierick et al. 2021). Certaines de ces cellules sont situées à la transition entre des zones muscularisées et non muscularisées des artères et peuvent se dédifférencier notamment en condition d'hypoxie ou avec une augmentation de PDGF et prolifèrent le long des zones non muscularisées et participent au remodelage des APs (Sheikh et al. 2015).

5.3. Altération des mécanismes cellulaires

5.3.1. Altération de la balance prolifération/apoptose

Une des premières caractéristiques des cellules vasculaires pulmonaires de patients atteints d'HTAP est cette évolution d'un phénotype quiescent (peu prolifératif) à un phénotype hyperproliferatif associé à une inhibition de l'apoptose ce qui déséquilibre d'autant plus la balance vers la voie de la prolifération. La dérégulation de facteurs de croissance et certains facteurs de transcription ont été mis en évidence pour être impliqués dans ce processus pro-prolifératif dans l'HTAP.

5.3.1.1. Facteurs de croissance

PDGF

La famille des platelet derived growth factor (PDGF), comprend 4 membres (PDGFA-D) et deux récepteurs PDGFRα et PDGFRβ. Ce sont des peptides qui se dimérisent et peuvent se fixer sur leur récepteur à activité tyrosine kinase. Il a été décrit que le PDGF-A et PDGF-B sont présents à des niveaux très faibles dans les vaisseaux pulmonaires sains et que le PDGF-C est le plus présent au niveau des CML-APs tandis que le PDGF-D est sécrété au niveau des fibroblastes. Les deux récepteurs sont présents à la membrane des CMLs. En 1998, Humbert et al ont mis en évidence une expression augmentée du PDGF dans les poumons de patients atteints d'HTAP et d'HTAP associées au VIH (M. Humbert et al. 1998). De plus, il a été montré que le PDGF entraine l'augmentation de la prolifération des CML-APs (Yu et al. 2003). L'ARNm des deux récepteurs au PDGF ainsi que le PDGF-A et PDGF-B a été retrouvé augmenté dans les APs de patients atteints d'HTAP. De plus, l'inhibition des PDGFR par un inhibiteur de tyrosine kinase, tel que l'imatinib, *in vivo* réduit le remodelage vasculaire pulmonaire dans deux

modèles expérimentaux d'HTAP (Schermuly et al. 2005; Perros et al. 2008). Néanmoins, d'autres molécules inhibitrices des récepteurs aux tyrosines kinases ont été démontrées comme pouvant provoquer le développement d'HTAP comme le dasatinib (on recense une cinquantaine de cas (Weatherald et al. 2017)). Le dasatinib est un médicament donné dans le traitement des leucémies myeloïdes chroniques. Il a été démontré que le dasatinib peut entrainer une dysfonction des CE-APs par l'augmentation de la production de ROS et un remodelage vasculaire pulmonaire alors que l'imatinib n'a pas ces effets (Guignabert et al. 2016). Néanmoins, il a été mis en évidence la nécessité d'un « second hit », car l'injection seule de dasatinib chez le rat ne permet pas le développement d'une HTP. De plus, le dasatinib peut inhiber la src tyrosine kinase (SrcTK) qui est connue notamment pour réguler le tonus vasculaire par l'activation de KCNK3/TASK-1. En effet, il a été montré que l'inhibition de la SrcTK dans les CML-APs humaines entrainait une diminution du courant KCNK3/TASK1 et donc une dépolarisation des CML-APs (Nagaraj et al. 2013).

Le « second hit » requis chez l'homme pour entrainer le développement de l'HTAP reste non élucidé, mais pourrait s'expliquer par des prédispositions génétiques (mutations BMPR2, KCNK3...) ou des facteurs environnementaux (Weatherald, Chaumais, et Montani 2017).

VEGF

Le vascular endothelial growth factor (VEGF) est un facteur de croissance présentant plusieurs variants d'épissage et jouant un rôle dans le maintien de la structure du poumon. Il a également été décrit pour son implication dans l'angiogenèse tumorale (Claesson-Welsh et Welsh 2013). Le VEGF reconnait son récepteur VEGFR1 ou 2. Le VEGFR2 est le récepteur le plus abondant dans le système vasculaire pulmonaire, c'est un récepteur de type tyrosine kinase. Chez les patients atteints d'HTAP plusieurs études ont confirmé une augmentation du VEGF au niveau des APs et notamment dans les lésions plexiformes de patients HTAP (Tuder et al. 1994) ainsi que dans les modèles animaux avec une augmentation du VEGF et des récepteurs VEGFR1 et 2 dans les poumons de rats en hypoxie chronique (Christou et al. 1998; Tuder, Flook, et Voelkel 1995). Néanmoins, certaines études ont montré un effet inverse avec une diminution de l'expression du VEGF notamment dans les poumons de rats en hypoxie chronique (Yamamoto et al. 2008). Paradoxalement, le sugen (SU5416), un inhibiteur du VEGFR2 couplé avec une hypoxie chronique entraine une forme sévère d'HTP aux rats

(Taraseviciene-Stewart et al. 2001). L'hypothèse de cette action serait que le sugen induit une forte apoptose des CE-APs, les cellules résistantes développeraient un phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique qui pourraient initier une forte dysfonction endothéliale et donc un remodelage vasculaire pulmonaire (Sakao et al. 2005). Récemment, une étude a démontré que l'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique du VEGFR2, le cabozantinib dans un modèle de rats en hypoxie chronique n'entraine pas d'augmentation des PAPm (Sitapara, Sugarragchaa, et Zisman 2021). Elle conclut que l'action du SU5416 passe également par l'inhibition de BMPRII.

TGF-β

La superfamille du TGF-β (transforming growth factor-β) compte 37 protéines. Cette famille est divisée en deux voies distinctes, celle passant par l'activation du récepteur TGF-βR et celle passant par l'activation de BMPRII. Ce sont des récepteurs transmembranaires à activité sérine/thréonine kinase et sont activés par des ligands spécifiques. Les ligands BMP/GDF pour la voie du BMPRII et des ligands tels que les TGF-β1-3 et l'activine pour la voie du TGF-βR. BMPRII et le TGF-βR sont des récepteurs de types 2 qui nécessitent d'être couplés avec un récepteur de type 1 (ALK1-7) pour être fonctionnel.

L'activation de ses voies va entrainer des réponses différentes, dans la voie canonique dépendante des SMAD, l'activation de BMPRII va permettre la phosphorylation des SMAD1/5/8 tandis que pour le TGF-βR ce seront les SMAD2/3. Les SMAD1/5/8 vont s'associer avec un co-activateur, SMAD4. La translocation de ce complexe au noyau lui permet d'assurer son rôle de facteur de transcription. La voie du TGF-β va permettre l'activation de la voie des MAPkinases, du facteur NF-κB (nuclear factor-kappa B) ce qui régule positivement les processus de prolifération, migration et angiogenèse (Tielemans et al. 2019).

En condition normale, c'est la balance d'activation de ces deux voies qui permet le maintien d'un équilibre dans la croissance et le développement cellulaire(Figure 30).

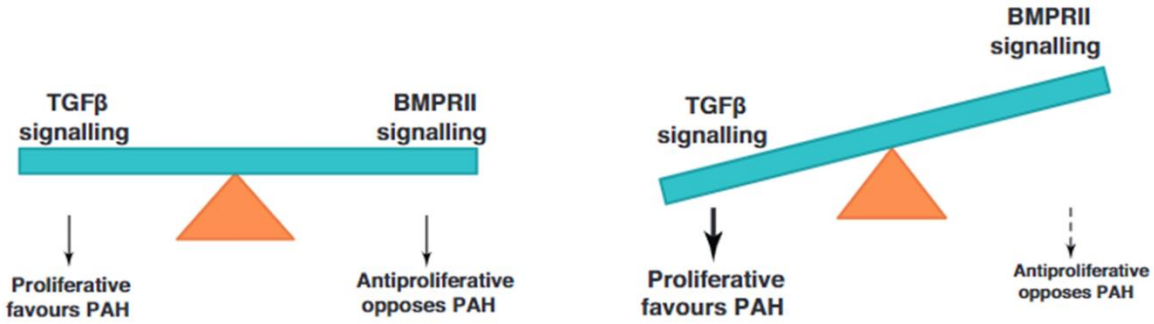


Figure 30 Schéma représentant le déséquilibre de la voie du TGF-β dans l'HTAP (de Tielemans 2019)

Dans l'HTAP, il a été bien décrit que ces deux voies sont dérégulées et contribuent à la pathogenèse de l'HTAP, par la découverte de mutations dans le gène *BMPR2* ainsi que plusieurs membres de cette voie (SMAD8, ALK1, BMP9/10). Il a été montré que des CML-APs de patients atteints d'HTAP montraient une réponse altérée de la voie du BMPRII et une réponse anormalement grande au TGF-β (Morrell et al. 2001). Une autre étude a montré une forte expression du TGF-β1 dans les CE-APs de patients atteints d'HTAP et notamment au niveau des lésions plexiformes (Jonigk et al. 2011). Dans les modèles animaux par exposition à la MCT et l'hypoxie chronique, il a également été démontré dans plusieurs études une augmentation du TGF-β et de l'activine ainsi que leur implication dans le remodelage vasculaire pulmonaire et l'inflammation (Ahmed et al. 2014; Yun Liu et al. 2016). La dysfonction de cette voie à une implication importante dans la pathologie de l'HTAP, c'est pourquoi de nouvelles thérapies ciblant certains de ces acteurs sont en cours d'essais cliniques (voir partie 6.5)

5.3.1.2. La sérotonine

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est synthétisée via l'acide aminé L-tryptophane. C'est un neurotransmetteur qui agit de manière paracrine dans tout le corps humain. Il va principalement être métabolisé dans le foie et les poumons.

Il existe 7 récepteurs au 5-HT, de 5-HT1 à 5-HT7. Certains de ces récepteurs sont présents au niveau des CE-APs et il a été montré que la production de sérotonine dans les CE-APs se fait par l'action de l'enzyme tryptophane hydroxylase-1 (Tph-1) qui est augmentée dans les CE-APs de patients atteints d'HTAP de même que la production de 5-HT (Eddahibi et al. 2006). La

production de 5-HT par les CE-APs peut jouer un rôle paracrine sur les CML-APs qui entraine leur contraction et prolifération (M. R. MacLean et al. 1996).

Les récepteurs à la sérotonine présents au niveau des CML-APs sont le 5-HT_{1B} et le 5-HT_{2A}. Il a d'ailleurs été mis en évidence une augmentation du 5-HT_{1B} dans les CML-APs de patientes atteintes d'HTAP. Cette augmentation serait une conséquence de la diminution d'expression du miRNA-96 médiés par l'action des œstrogènes (Wallace et al. 2015).Il existe également un transporteur à la sérotonine SERT ou 5-HTT, et sa surexpression chez la souris a entrainé le développement d'une HTP (Margaret R. MacLean et al. 2004). Ce transporteur permet l'entrée de 5-HT dans les CML-APs qui peut aller activer des tyrosines kinases activatrices du cycle cellulaire et la translocation au noyau de MAPkinases (S. L. Lee et al. 1999; Yinglin Liu et al. 2004).

5.4. Altération du tonus vasculaire pulmonaire

5.4.1. Facteurs vasoconstricteurs

5.4.1.1. Endotheline-1 (ET-1)

La famille des endothélines est composée de 3 isopeptides ET-1, ET-2 et ET-3. ET-1 est l'isoforme le plus exprimé dans le système cardiovasculaire. Le gène de l'ET-1 code pour une préproendotheline de 203 acides aminés qui sera clivée en une pro-ET-1 de 38 acides aminés par une furine convertase. Enfin l'ET-1 mature est produite par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) en un peptide actif de 21 acides aminés (Chester et Yacoub 2014). Elle est ensuite sécrétée par les CEs. Il existe deux types de récepteurs a l'ET-1, ET-A et ET-B. Ce sont des récepteurs couplés à des protéines G-αq. Le récepteur ET-A est localisé au niveau des CML-APs alors que le récepteur ET-B est présent au niveau des CML-APs et des CE-APs (Galié, Manes, et Branzi 2004). Les récepteurs au niveau des CML-APs vont, en présence d'ET-1 activer la PLC via la protéine Gqα. La PLC va ensuite transformer le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 peut alors se fixer sur son récepteur au niveau du RE et entrainer une libération de calcium intracellulaire, ce qui augmente la $[Ca^{2+}]_i$ et donc entraine une contraction des CML-APs. Le DAG peut quant à lui aller activer la protéine kinase C (PKC) qui peut ensuite aller activer des voies de prolifération cellulaire telle que la voie des MAPkinases. Chez les patients atteints d'HTAP, l'ET-1 est augmentée au niveau des APs muscularisées, des lésions plexiformes et des CE-APs

comparées à des patients contrôles (Giaid et al. 1993). Ces taux ont été corrélés avec l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. C'est pourquoi des antagonistes aux récepteurs à l'endothéline-1 sont développés depuis les années 2000 et ont montré leur efficacité chez les patients atteints d'HTAP ainsi que dans les modèles animaux (Jasmin et al. 2001; Lewis J. Rubin et al. 2009) (voir partie 6.2).

5.4.1.2. Thromboxane A2

Le thromboxane A2 (TXA2) fait partie de la famille des prostanoides. Il provient de l'acide arachidonique (AA) qui est transformé en prostaglandine H2 (PGH2). La PGH2 va ensuite donner le thromboxane A2 au niveau des thrombocytes (plaquettes) alors qu'elle produit la prostacycline dans les CEs(Figure 31). Le TXA2 joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire et la régulation de la coagulation sanguine. Sa demi-vie étant de 30 secondes, le TXA2 a une action autocrine ou paracrine pour réguler positivement la production de plaquettes et la production de TXA2. Le TXA2 a son récepteur couplé à une protéine Gq ce qui entraine une vasoconstriction des CML-APs. Au niveau des CE-APs il a été montré que le TXA2 peut promouvoir la migration et l'angiogenèse (Daniel et al. 1999). Un déséquilibre dans la production du TXA2 et dans la prostacycline a été observé dans les urines de patients atteints d'HTAP avec une augmentation du 11-dehydro-thromboxane B2, un métabolite stable du TXA2 et une diminution du 2,3-dinor-6-keto PGF1α, un métabolite de la prostacycline (Christman et al. 1992). Cette découverte a mis en évidence une dérégulation des CE-APs d'une part et la perte d'équilibre dans la sécrétion des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs dans l'HTAP. D'autre part, dès 1997, une étude sur des rats MCT a mis en évidence que l'inhibition du TXA2 (ONO-8809) entrainait une amélioration de l'HTP (Nagata et al. 1997).

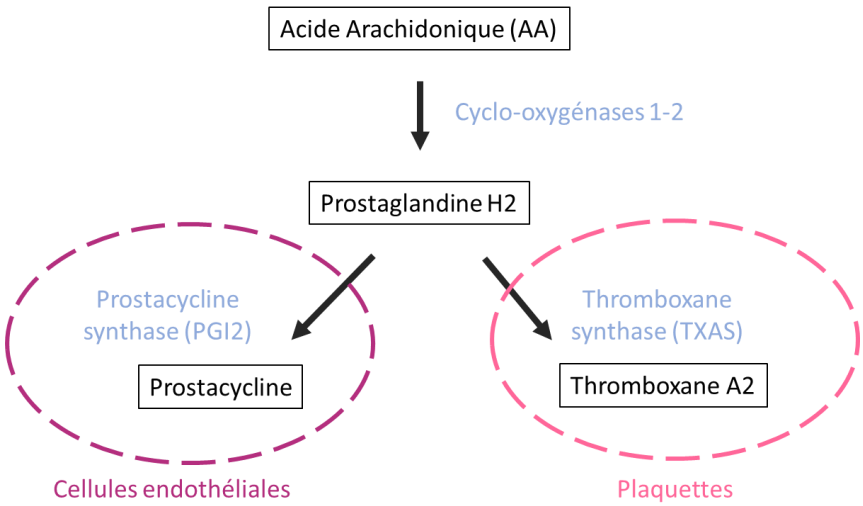


Figure 31 Schéma représentant la synthèse du thromboxane A2 et de la prostacycline

C'est pour cela qu'un inhibiteur de la thromboxane synthase et antagoniste du récepteur au TXA2, le terbogrel a été testé chez des patients atteints d'HTAP. Ce traitement a permis une forte diminution du métabolite thromboxane B2, mais a échoué à améliorer les paramètres hémodynamiques ainsi que le test de marche des patients traités. De plus, les patients traités présentaient de fortes douleurs aux jambes ce qui a complètement exclu ce traitement (Langleben et al. 2002). Néanmoins, l'inhibition de la voie du TXA2 reste une cible intéressante dans l'HTAP. Récemment, une nouvelle étude a montré que le NTP42, un nouvel antagoniste du récepteur au TXA2, permet d'améliorer les paramètres hémodynamiques de rats traités à la MCT et que cette amélioration est similaire au traitement avec du sildenafil (inhibiteur des PDE5) et selexipag (analogue de la prostacycline) deux traitements utilisés pour traités les patients atteints d'HTAP. Ils ont obervé une diminution plus importante de l'inflammation dans le tissu pulmonaire des rats MCT-NTP42 que les rats MCT traités avec les autres molécules (Mulvaney, Reid, Bialesova, Bouchard, et al. 2020). De plus, une étude réalisée sur des rats Sugen-hypoxie a révélé que l'administration de NTP42 + Sildenafil améliorait davantage encore les paramètres hémodynamiques que l'administration de ces molécules données séparément (Mulvaney, Reid, Bialesova, Mendes-Ferreira, et al. 2020). Un essai clinique de phase I, pour tester la sécurité, la tolérance et la pharmacocinétique du NTP42 sur des sujets sains est en cours (ATXA Therapeutics Limited 2021).

5.4.2. Facteurs vasodilatateurs

5.4.2.1. La voie du monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un radical libre produit par les CE et est formé par l'oxydation de la L-arginine qui va former la citrulline et le NO par l'action de la NO synthase (NOS). Dans les CEs, l'enzyme a l'origine de la synthèse du NO est la e-NOS (endothelial NOS) (Moncada et Higgs 1993). Le NO peut ensuite diffuser à travers la membrane plasmique des CML-APs et venir stimuler la guanylate cyclase soluble (sGC) pour produire du GMP cyclique (GMPc) qui va pouvoir activer PKG et entrainer la relaxation des CML-APs et de l'artère (Sausbier et al. 2000). Il a également était montré que le GMPc peut inhiber la prolifération des CE-APs et CML-APs (Tanner et al. 2000). Le GMPc est métabolisé par la phosphodiesterase 5 (PDE-5). Il existe 11 types de phosphodiesterases (PDE). Les PDE les plus abondantes dans les CML-APs sont les PDE-1, PDE-3, PDE-4 et PDE-5. Les PDE-3 et PDE-4 ont une meilleure affinité pour métaboliser l'AMP cyclique (AMPc). Ce sont majoritairement les PDE-5 qui métabolisent le GMPc dans les CML-

APs. L'expression de PDE-5 a été retrouvée augmentée dans plusieurs modèles animaux d'HTP ainsi que dans les poumons de patients atteints d'HTAP (Murray, MacLean, et Pyne 2002; Wharton et al. 2005).

Une réduction d'expression de la eNOS dans les poumons de patients atteints d'HTAP a également été observée et cette diminution est inversement proportionnelle à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires (Giaid et Saleh 1995). De plus, le NO exhalé est également diminué chez les patients atteints d'HTAP (Kaneko et al. 1998). D'autres études plus récentes semblent cependant ne pas montrer de différence voir montrer une augmentation de l'expression de la eNOS chez les patients atteints d'HTAP (Berger et al. 2001; Zhao et al. 2009). Dans les modèles animaux d'HTAP, il a été retrouvé que la eNOS est augmentée dans les poumons de rats en hypoxie chronique (Le Cras et al. 1996).

L'explication de ces différences d'expression est que l'expression de la eNOS n'est pas liée à la production de NO. L'idée serait plutôt qu'il y aurait une modulation de son activité qui entrainerait une diminution de la production de NO. En effet la eNOS peut également produire des superoxydes (H_2O_2, $OONO^-$) au lieu du NO qui peuvent avoir pour action de piéger le NO et donc diminuer sa disponibilité dans les cellules (Klinger, Abman, et Gladwin 2013).

L'importance de cette voie pour la relaxation des artères et la découverte de dérégulations de la voie du NO dans l'HTAP a entrainé la recherche de cibles pour essayer de restaurer son activité. L'inhalation de NO par les patients a été la première thérapie ciblant cette voie. Cette thérapie a montré une amélioration des paramètres hémodynamiques, mais cela implique une inhalation continue de NO du fait de sa très courte demi-vie ce qui a rendu sa mise en œuvre compliquée. Les traitements actuels de l'HTAP ciblant cette voie sont un activateur de la sGC et un inhibiteur des PDE-5 (voir partie 6.3).

5.4.2.2. La voie de la prostacycline

La prostacycline a la même origine que le thromboxane A2, elle est un dérivé de l'acide arachidonique et est produite par les CE-APs (voir figure 31). Contrairement au TXA2, la prostacycline est un puissant vasodilatateur qui a également pour rôle l'inhibition de l'adhésion plaquettaire et la croissance cellulaire. Comme expliqué plus haut, il a été retrouvé un déséquilibre dans la production de TXA2 et de prostacycline. Il a notamment été mis en évidence une diminution du 2,3-dinor-6-keto PGF1α, un métabolite de la prostacycline dans les urines de patients atteints d'HTAP (Christman et al. 1992). Une autre étude a montré une

diminution de la prostacycline synthase dans les poumons de patients atteints d'HTAP (Tuder et al. 1999). Plusieurs analogues de la prostacycline sont actuellement donnés comme traitements aux patients atteints d'HTAP (voir partie 6.1)

5.5. Inflammation et HTAP

Plusieurs pathologies inflammatoires ont été reliées au développement de l'HTAP comme le VIH, des connectivites ou même des infections parasitaires. Au-delà de ces pathologies, la présence d'inflammation est observée dans les poumons de la plupart des patients atteints d'HTAP. Certains types cellulaires comme des lymphocytes, des cellules dendritiques ou des neutrophiles sont retrouvés en grand nombre au niveau des vaisseaux pulmonaires de patients atteints d'HTAP, de même que des hauts niveaux de cytokines et chemokines sont retrouvés dans le sérum de patients atteints d'HTAP. Parmi ces cytokines, l'IL-1β est un important messager de la réponse inflammatoire. Des taux élevés d'IL-1β ont été détectés chez des patients atteints d'HTAP et ces taux sont proportionnels à la sévérité de la maladie (Soon et al. 2010). De plus, il a été démontré que l'IL-1β stimule la prolifération et la contraction des CML-APs en inhibant la voie de la prostacyline et en diminuant la production d'AMPc (A. Itoh et al. 2003).

L'IL6 est également une cytokine qui est un marqueur de progression de l'HTAP (M. Humbert et al. 1995). Une étude réalisée sur des souris transgéniques surexprimant l'IL6 a mis en évidence que la seule surexpression de l'IL6 peut entrainer le développement d'une légère HTP (Steiner et al. 2009, 6). Les CML-APs de patients atteints d'HTAP présentent également une augmentation de l'expression de l'IL6-R, le récepteur de cette cytokine. La surexpression de l'IL6R entraine un phénotype anti-apoptotique des CML-APs de patients atteints d'HTAP (Tamura et al. 2018).De plus, les souris transgéniques *Sm22a-Cre IL6R*, qui ont perdu l'expression de l'IL6R dans les cellules exprimant SM22A (majoritairement les CMLs) sont protégées contre l'HTP induite par exposition à l'hypoxie chronique. Enfin, l'inhibition de l'IL6R avec un antagoniste de l'IL6R réduit le phénotype d'HTP de deux modèles expérimentaux d'HTP (Rats MCT et Su-Hx)

Certains marqueurs inflammatoires sont également anormalement augmentés dans l'HTAP comme le facteur MIF (macrophage migration inhibitory factor) (Marshall et al. 2017; Le Hiress et al. 2015) et HIMF (hypoxia-induced mitogenic factor) (Angelini et al. 2009). Ces molécules peuvent notamment promouvoir la production de cytokines (Johns et al. 2016).

L'inflammation dans l'HTAP vient également de la présence de plusieurs types cellulaires tels que des lymphocytes T, des macrophages ainsi que des cellules dendritiques. On les retrouve notamment près des vaisseaux pulmonaires remodelés, infiltrés dans les différentes couches des vaisseaux, par exemple les cellules dendritiques ont été retrouvées dans l'adventice et la média des APs de patients atteints d'HTAP (F. Perros et al. 2007). De plus, les cellules dendritiques de patients atteints d'HTAP peuvent induire une plus forte activation et prolifération des lymphocytes T CD4+, associée à une augmentation de l'expression de l'IL17 (T helper 17 response) (Hautefort et al. 2015).

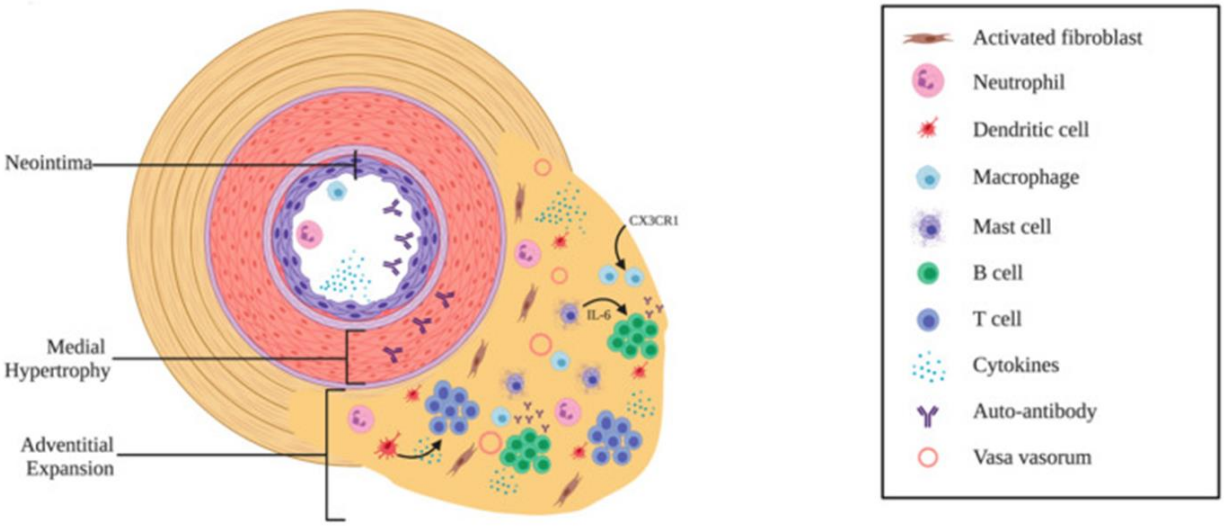


Figure 32 Schéma représentant les différents acteurs impliqués dans la réponse inflammatoire dans l'HTAP (Hu et al. 2020)

5.6.Micro ARN et HTAP

Les micro ARNs (miR) sont des petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides, qui sont à l'origine de la régulation de la moitié de nos ARNm. Ainsi, les miRs peuvent modifier l'expression de multiples protéines en se fixant de manière complémentaire sur leur ARNm cible en s'hybridant sur le MRE (miRNA Response Element) qui se trouve généralement dans la région 3'-UTR des ARNs. Cette inhibition permet la dégradation de l'ARNm soit par clivage endonucléotidique si le degré d'homologie entre le miR et l'ARN est important ou en inhibant la traduction par un clivage exonucléotidique (Condorelli, Latronico, et Cavarretta 2014). Ils peuvent ainsi réguler de multiples processus tels que la prolifération, l'apoptose, la migration...

Plusieurs miRs ont été retrouvés altérés chez les patients atteints d'HTAP ou dans des modèles animaux de la maladie (Tableau 5). Certaines de leurs cibles ont alors été étudiées afin de mieux comprendre leur impact sur la physiopathologie de l'HTAP.

micro ARN	**Changement dans l'HTAP**	**Types de tissus**	**Cibles**	**Fonction**	**Références**
miR-29	↓	FA-APs de rats hypoxiques	α-SMA, collagène de la MEC	Fibrose	(Luo et al. 2015, 29)
		CML-APs Rats MCT	Collagen I		(T. Wang et al. 2018)
miR-124	↓	CML-APs HTAP humaine	NFAT	Proliferation CML-APs	(Kang et al. 2013)
		CE-APs et FA-APs HTAP humaines	PTPB1, MCP-1	Proliferation	(Caruso et al. 2017)
miR-140	↓	CML-APs Rats MCT	TNF-α	Proliferation CML-APs	(T.-T. Zhu et al. 2019)
		SU/Hx/Nx et CML-APs rat MCT	SMURF1		(Rothman et al. 2016)
		CML-APs humaine hypoxique	SOD2		(Y. Zhang et Xu 2016)
miR-204	↓	CML-APs HTAP humaine	HIF-1α	Proliferation CML-APs	(J. Meloche et al. 2014)
		CML-APs HTAP humaine	RUNX2		(Ruffenach et al. 2016)
		CML-APs HTAP humaine et Rat MCT	SHP2, Src kinase, NFAT		(Courboulin et al. 2011)
		CE-APs HTAP humaine et Rat hypoxie	ATG7	Autophagie	(T. Liu et al. 2019)
miR-210	↑	CML-APs Rat Hypoxie	ISCU	Proliferation CML-APs	(Lu et al. 2017)
			E2F3		(Gou et al. 2012)
			MKP-1		(Jin et al. 2015)
miR-1	↑	Plasma humain HTAP et poumons de rats Su/Hx/Nx	SOD1, Cx43, CAV2, KLF4	Dysfonction endothéliale	(Mondejar-Parreño, Callejo, Barreira, Morales-Cano, Esquivel-Ruiz, Filice, et al. 2019)
		Poumons de rats Su/Hx/Nx	KCNA5	Hypertrophie CML-APs	
	↓	CML-APs HTAP humaine et Rat hypoxie	SphK1	Proliferation CML-APs	(Sysol et al. 2018)
		VD Rat MCT	TGFβ	Hypertrophie du VD	(Connolly et al. 2020)
miR-130/301	↑	Poumon de Souris SU/Hx/Nx et CE-APs/CML-APs humaine	EDN1	Vasoconstriction	(Thomas Bertero et al. 2015)

		CE-APs souris MCT	BMPR2	Remodelage vasculaire pulmonaire	(Li Li et al. 2017)
		Fibrose pulmonaire, poumons de souris	PPARγ-APOE-LRP8	Fibrose	(T. Bertero et al. 2015)
miR-138	↑	CML-APs Rat Hypoxie	Mst1	Proliferation CML-APs	(S. Li et al. 2013, 1)
		CML-APs HTAP humaine	MCUC		(Hong et al. 2017)
		CML-APs HTAP humaine	KCNK3		(J.-J. Liu et al. 2018)
		Poumons de Rats MCT	KCNK3 / SLC45A3	Remodelage vasculaire pulmonaire	(Le Ribeuz, Courboulin, et al. 2020)
miR-17∼92	↑	CE-APs HTAP humaine	BMPR2	Survie CE-APs	(Brock et al. 2009)
		Poumons de souris hypoxie et rat MCT	p21	Proliferation CML-APs	(Pullamsetti et al. 2012)
		CML-APs HTAP humaine	PDLIM5	Dédifferentiation CML-APs	(T. Chen et al. 2015, 17)
		CML-APs souris hypoxie	PHD2	Proliferation CML-APs	(Tianji Chen et al., s. d., 20)
miR-21	↑	CE-APs HTAP humaine	BMPR2, RhoB	Diminution de l'angiogenèse et vasodilatation	(Parikh et al. 2012)
		CML-APs HTAP humaine	PTEN	Proliferation CML-APs	(B. Zhu, Gong, et al. 2018, 21)
		Tissu pulmonaire humain HTAP	DDAH1		(Iannone et al. 2014)
		Poumon souris hypoxie	BMPR2		(S. Yang et al. 2012)
miR-214	↑	CML-APs HTAP humaine	PTEN, CCNL2	Proliferation CML-APs	(H. Liu et al. 2016)
		CML-APs hypoxie	ARHGEF12		(Xing et al. 2019)
		CML-APs HTAP humaine	MEF2C, MYOCD, SMC		(Sahoo et al. 2016)
miR-223	↓	CML-APs HTAP humaine	PARP-1	Prolifération des CML-APs	(Jolyane Meloche et al. 2015)
		Poumons de souris hypoxie et rats MCT/ CML-APs humaines et rat	RhoB, MYPT1, MLC2		(Zeng et al. 2016)
		CML-APs de rat MCT	ITGB3		(A. Liu et al. 2019)
miR-424	↑	Plasma humain HTAP et CE-APs de rat MCT	SMURF1, BMPR2	Hypertrophie du VD	(Baptista et al. 2018)
	↓	Rat SU/Hx/Nx, MCT et CE-APs humain	FGF2, FGFR1	Prolifération des CML-APs	(Kim et al. 2013)

Tableau 5 Tableau récapitulatif de tous les miR étant impliqués dans l'HTAP

Suite à ce tableau récapitulatif des différents mirs impliqués dans l'HTAP, je vais détailler plus particulièrement les miR qui peuvent jouer un rôle dans l'expression/fonction des canaux K^+

5.6.1. miR 204

En 2011, Courboulin et al ont démontré que l'expression du miR-204 était diminuée dans les poumons et les CML-APs de patients atteints d'HTAP ainsi que dans deux modèles expérimentaux d'HTAP. Ils ont également montré que cette diminution était proportionnelle à la sévérité de la pathologie. *In vitro*, ils ont pu mettre en évidence que cette diminution d'expression de miR-204 était reliée à l'activation de la voie pro-prolifération Src-STAT3-NFAT dans les CML-APs HTAP (Courboulin et al. 2011). Pour finir, ils ont également administré par nébulisation le miR-204 à des rats MCT et ont montré une amélioration du phénotype d'HTP de ces rats. Ce même groupe, a également montré dans une autre étude que la réexpression d'un analogue de miR-204 dans les CML-APs humaines entrainait une diminution de l'expression de RUNX2 un facteur de transcription surexprimé dans l'HTAP et impliqué dans la calcification des vaisseaux pulmonaires (Ruffenach et al. 2016).

5.6.2. miR 138

En 2011, Courboulin et al ont identifié plusieurs miRs dérégulés dans les CML-APs de patients atteints d'HTAP, dont miR-138 qui etait augmenté (Courboulin et al. 2011). Plus tard l'augmentation de l'expression de miR-138 a également été mise en évidence dans des CML-APs de rats exposés à l'hypoxie. Cette surexpression a été corrélée avec la suppression de l'apoptose dépendante de l'activité caspase (S. Li et al. 2013). De plus, il a été montré que la serine/thréonine kinase mst1 pourrait être une cible de mir138. En 2017, Hong et al ont montré que la diminution d'expression du MCUC (mitochondrial calcium uniporter complex) entrainait dans les CML-APs un phénotype HTAP (diminution de la $[Ca^{2+}]$ mitochondriale, prolifération, fission mitochondriale...). Dans cette étude, ils ont démontré que la diminution de la MCUC est expliquée par l'augmentation de l'expression de miR138 dans les CML-APs HTAP (Hong et al. 2017). Ils ont également montré que la transfection des CML-APs contrôles avec un analogue de miR-138 induisait « un phénotype HTAP » des CML-APs contrôles, caractérisés par une augmentation de la prolifération et hyperpolarisation des membranes mitochondriales. De plus, des analyses bio-informatiques ont montré que l'ARNm de KCNK3 contient des sites d'homologie avec miR-138, ce qui veut dire que dans l'HTAP KCNK3 pourrait être une cible directe de miR-138, et donc une augmentation de l'expression de miR-138 dans

les CML-APs HTAP pourrait induire une diminution de l'expression de KCNK3 (J.-J. Liu et al. 2018).

Suite à ces études, nous nous sommes intéressés au rôle de miR-138 dans la régulation de KCNK3 *in vivo* chez le rat. En effet, en 2020 nous avons montré que l'administration par nébulisation d'un inhibiteur de miR-138 dans le modèle de rat MCT entraine une amélioration des paramètres hémodynamiques, du remodelage vasculaire, de l'inflammation pulmonaire et de la prolifération cellulaire. Cette inhibition *in vivo* de miR-138 a permis de restaurer l'expression de l'ARNm de KCNK3 dans les poumons des rats traités, ainsi que de SLC45A3 une autre cible potentielle de miR-138 (Le Ribeuz et al. 2020). Cela confirme l'implication de miR-138 dans le développement de l'HTAP, via la dérégulation de KCNK3.

5.6.3. miR-1

Plus récemment une étude a montré la surexpression de miR-1 dans les poumons du modèle de rat Sugen-hypoxie. Ils ont mis en évidence qu'une cible directe de miR-1 était Kv1.5, un canal potassique dont l'expression est fortement diminuée dans ce modèle de rat et dans l'HTAP (Mondejar-Parreño, Callejo, Barreira, Morales-Cano, Esquivel-Ruiz, Moreno, et al. 2019, 1).

5.7. Implication des canaux K^+ dans la physiopathologie de l'HTAP

Connaissant le rôle des canaux K^+ dans le maintien du potentiel de membrane et donc sur la régulation du tonus vasculaire des CML-APs, leur implication dans le remodelage vasculaire pulmonaire observé dans l'HTAP a été décrit très tôt (Mandegar, Remillard, et Yuan 2002). La perte d'expression ou d'activité des canaux K^+ peut également entrainer une inhibition de l'apoptose ainsi qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]i$ ce qui va entrainer une vasoconstriction et prolifération cellulaire (Mandegar et Yuan 2002).

5.7.1. Canaux Kv

La dysfonction des canaux Kv dans l'HTAP a été décrite en premier par Yuan et al en 1998 en mettant en évidence une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ liée à la diminution de I_{KV} dans les CML-APs de patients atteints d'HTAP (J. X.-J. Yuan et al. 1998). Cette diminution de IKv était corrélée

à une diminution de l'ARNm de Kv1.5 dans les CML-APs HTAP (X.-J. Yuan, Wang, Juhaszova, Gaine, et al. 1998). Une diminution de l'ARNm de Kv1.5 a également été retrouvée dans les poumons de patients atteints d'HTAP mutés pour le gène *BMPR2*. L'exposition des CML-APs avec du BMP2 induit une augmentation de l'expression protéique de Kv1.5 (Young et al. 2006). Plusieurs études ont mis en évidence que la fonction de Kv1.5 peut être régulée négativement par les voies de signalisations dépendantes de la PLC via l'activation des récepteurs aux protéines Gq tels que les récepteurs à la 5-HT et au TXA2 ou l'ET-1. Cela aboutit au clivage du PIP2 en IP3 et DAG, le premier entraine une déplétion des stocks de Ca^{2+} de RE ce qui entraine une augmentation de la [Caet le deuxième peut activer notamment la PKC qui peut venir inhiber directement Kv1.5 (Boucherat et al. 2015). Un lien entre l'expression de la sérotonine et la diminution du courant Kv1.5 a été mis en évidence dans les CML-APs, ainsi que l'internalisation de Kv1.5 dans des cavéoles et donc la diminution de ce canal à la membrane plasmique des cellules (Cogolludo et al. 2006). De plus, l'endocytose des canaux Kv2.1 et Kv1.5 a également été décrite comme un mécanisme régulateur important de ces canaux, ce mécanisme peut être régulé via la Src kinase(figure 33) (Nesti, Everill, et Morielli 2004).

La perte d'expression de Kv1.5 a également été décrite dans plusieurs modèles expérimentaux d'HTAP tel que le l'hypoxie chronique chez le rat (Bonnet et al. 2006; Whitman et al. 2008) ou la surexpression du facteur HIF1α entraine la diminution d'expression de Kv1.5. De plus, chez la souris déficiente pour Kv1.5, il a été mis en évidence une réduction de la sensibilité à l'hypoxie ainsi qu'une altération de la vasoconstriction médiée par l'hypoxie (Stephen L. Archer et al. 2001). L'hypoxie aiguë sur des CML-APs de rats a suggéré que ces canaux Kv1.5 étaient sensibles au taux d'oxygène (Firth et al. 2009). En effet, les canaux Kv1.5 sont connus pour être des senseurs du niveau d'oxygène.

En 2003, il a été montré que le transfert du gène de Kv1.5 (KCNA5) *in vivo* chez des rats exposés à l'hypoxie chronique (4 semaines) réduit le développement de l'HTP (Pozeg et al. 2003). De plus, le traitement au Dichloroacetate un modulateur métabolique pouvant augmenter les courants I_K, a permis d'améliorer les paramètres hémodynamiques de rats en hypoxie chronique et ceci était corrélé avec l'augmentation de l'expression et de l'activité des canaux Kv2.1 (Michelakis et al. 2002).

Récemment, il a été mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de Kv1.5 pouvait entrainer le développement d'une HTAP. Le 4-aminopyridine (4-AP) (inhibiteur des canaux Kv) est un médicament qui peut être donné pour favoriser la marche chez des patients souffrant

de sclérose en plaque. Un cas d'HTAP a été rapporté après la prise de 4-AP, mais réversible après l'arrêt du traitement. Ce cas confirme l'implication importante de la dysfonction des canaux Kv dans la mise en place de l'HTAP (Ribeiro Baptista et al. 2019). De plus, une lettre qui fait suite à ce papier indique que le 4-AP peut également inhiber KCNK3 dont la perte d'expression et de fonction est un marqueur du développement de l'HTAP ce qui soutient que l'inhibition de ces canaux peut entrainer l'apparition d'une HTAP et qu'il faut donc monitorer finement (échographies cardiaques régulières) les patients traités avec le 4-AP (Antigny et al. 2019).

De plus, l'implication d'autres canaux Kv a été mis en évidence, notamment une diminution du courant Kv1.7 dans le modèle de rat monocrotaline (H. Lee, Kim, et Hong 2018). L'inhibition de Kv7 sur des APs de rats hypoxiques induit une vasoconstriction ce qui suggère une implication de ce canal dans le tonus vasculaire pulmonaire. De plus L'ARNm de KCNQ4 (Kv7.4) a été retrouvé diminué dans les APs de rats exposés à l'hypoxie chronique (Sedivy et al. 2015). L'activation *ex-vivo* de Kv7 sur des APs de souris entraine une forte vasorelaxation (Morecroft et al. 2009) et réduit *in-vivo* dans deux modèles murins d'HTP le remodelage vasculaire pulmonaire ainsi que la PAPm.

5.7.2. Canaux KATP

Peu d'études existent dans la littérature concernant le rôle des KATP dans la physiopathologie de l'HTAP. Une étude sur des souris Kir6.1$^{-/-}$dans les CMLs lymphatiques a montré qu'il n'y avait pas de différence dans la réponse contractile dans les vaisseaux lymphatiques de souris Kir6.1$^{-/-}$ comparée aux souris WT (Davis et al. 2020). À l'inverse, la souris transgénique avec gain de fonction pour Kir6.1 présente une réduction de la contractilité au niveau des CMLs mésentériques, ce qui confirme l'implication des canaux KATP dans le tonus vasculaire systémique (A. Li et al. 2013).

L'administration *in vivo* de nicorandil à des rats MCT, un activateur non sélectif des KATP, a montré une atténuation de la dysfonction endothéliale par l'augmentation de l'expression de la eNOS et la diminution de l'expression de la caspase-3 clivée. Ainsi qu'une amélioration des pressions sanguines de l'AP qui est en partie contrecarrée par un traitement combiné au glibenclamide. Le traitement des CML-APs avec un autre activateur des KATP, l'iptakalim a permis de mettre en évidence une forte diminution de la prolifération induite par l'ET-1 de même que le traitement avec le pinacidil (Y. Zhu et al. 2008). Plus récemment, l'iptakalim a

été utilisé en traitement dans le modèle de rat MCT et a entrainé une amélioration de plusieurs paramètres hémodynamiques ainsi qu'une diminution de l'expression de l'ET-1, des BNPs et du TNF-α (Zuo et al. 2011). Enfin, dans le modèle de rat hypoxie chronique, l'injection *in vivo* d'iptakalim atténue le remodelage vasculaire pulmonaire et l'inflammation pulmonaire (R. Zhu et al. 2015).

Aucune étude n'a étudié l'expression et le rôle de SUR1, SUR2A ou de SUR2B dans la physiopathologie de l'HTAP. Durant ma thèse je me suis intéressée à étudier le rôle des canaux KATP SUR1/Kir6.2 et SUR2/Kir6.1 au cours du développement de l'HTAP par des expériences *in vitro* sur des CML-APs et CE-APs humaines, *ex vivo* sur des APs de rats et humaines et *in vivo* dans plusieurs modèles animaux d'HTP.

5.7.3. Canaux K2P

Comme décrit en partie 4.2.2 des mutations du gène *KCNK3* ont été décrites chez des patients atteints d'HTAP depuis 2013. Plusieurs de ces mutations (8/16) entrainent une diminution ou perte de fonction du canal KCNK3. De plus, l'équipe a démontré une perte d'expression associée à une perte de fonction de KCNK3/TASK1 chez les patients atteints d'HTAPi et HTAPh, porteurs de la mutation *BMPR2*. Il a aussi été mis en évidence une perte de KCNK3/TASK1 dans le modèle de rat MCT. La dysfonction de KCNK3 est un marqueur d'hypertension pulmonaire. Il a également été mis en évidence par l'équipe que l'inhibition de KCNK3/TASK1 par un inhibiteur sélectif (A293) dans les CML-APs contrôle entrainait une dépolarisation du potentiel de membrane (-40mV A -30 mV). Cela confirme le rôle de KCNK3/TASK1 dans le maintien du potentiel de repos des CML-APs, précédemment mis en évidence par des expériences de siRNA (A. Olschewski et al. 2006). La contraction d'APs de rats à l'U46619 (analogue du TXA2) en présence d'A293 entraine une contraction plus rapide, avec un EC_{50} plus faible qu'en présence du solvant. (Antigny et al. 2016). De plus, l'inhibition pharmacologique de KCNK3/TASK1 *in vivo* chez le rat induit une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires ainsi qu'une légère augmentation des pressions sanguines du VD. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de KCNK3 est capable d'initier le développement de l'HTAP. Enfin l'activation de KCNK3/TASK1 par un activateur pharmacologique, le ONO-RS-082 (50mg/kg/jour) à court terme (de J14 à J21) *in vivo* dans le modèle de rats exposés à la MCT n'a pas permis de réduire le développement de l'HTP, alors que le traitement pendant 3

semaines (50mg/kg/jour) entraine une forte réduction des pressions sanguines systoliques du VD associée avec une diminution du remodelage vasculaire pulmonaire. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que KCNK3/TASK1 n'est plus exprimé dans le modèle MCT à partir de J14. Une autre étude à permis de montrer que la perte de fonction de KCNK3/TASK1 est une caractéristique de la dysfonction du VD, mis en évidence dans trois modèles de rats HTP, il a été mis en évidence que l'expression et la fonction de KCNK3/TASK1 étaient fortement réduites dans les cardiomyocytes du ventricule droit des rats MCT, hypoxie chronique et sugen-hypoxie (Lambert, Boet, et al. 2018).

La création de rats mutés pour le gène *Kcnk3* par CRISPR-Cas9 (délétion de 94 paires de bases dans l'exon 1 de KCNK3) a permis de caractériser les conséquences de la perte de KCNK3 dans le contexte de l'HTAP. La perte du courant KCNK3 dans les rats mutés a été validée par patch clamp dans les CML-APs de rats mutés. Une analyse des paramètres hémodynamiques à 4 mois a révélé une légère, mais significative augmentation des pressions systoliques du VD, mais pas des autres paramètres (débit cardiaque, index fulton) chez les rats *Kcnk3* mutés à l'état homozygote. De plus, la même étude réalisée sur des rats de 12 mois a révélé que 45% des rats mutés à l'état homozygote pour *Kcnk3* développent spontanément une HTP (>40mmHg).

L'induction de l'HTP chez les rats mutés (MCT et hypoxie chronique) pour *Kcnk3* a montré une aggravation du développement de la maladie comparée aux rats WT.

Des analyses *ex-vivo* sur les APs des rats ont mis en évidence une contraction précoce des APs des rats mutés par rapport aux APs WT. De plus, le traitement de CML-APs humaine contrôles avec un siKCNK3 a mis en évidence une prolifération plus importante de ces cellules comparées aux cellules traitées avec le siContrôle (Lambert et al. 2019). Enfin, plus récemment, la réalisation d'un cerclage de l'aorte, qui induit une insuffisance cardiaque gauche entraine le developpement d'une HTP plus importante chez les rats mutés pour *Kcnk3* comparé aux rats WT (Lambert et al. 2021).

5.7.4. Canaux K_{Ca}

Récemment, Babicheva a montré que la sous unité BK_{Ca} β1 est exprimé dans les CE-APs et que son expression est augmentée dans les CE-APs de patients atteints d'HTAPi. Cette augmentation est corrélée à la surexpression de miR-222 et la diminution d'expression de miR-138 dans les CE-APs HTAPi (Babicheva et al. 2020).

L'activation des canaux KCa avec l'acide docosahexaenoique (DHA) entraine la relaxation des APs de rats de manière endothélium dépendante et le traitement *in vivo* au DHA de rats exposés à l'hypoxie chronique permet une diminution des PAPm (Nagaraj et al. 2016). Enfin récemment, un nouvel activateur des canaux BK_{Ca}, plus sélectif appelé composé X (Ponte et al. 2012) a permis de diminuer partiellement les paramètres hémodynamiques de rats exposés à la MCT, et de diminuer le remodelage vasculaire pulmonaire ainsi que la fibrose au niveau du ventricule droit (Ferraz et al. 2021).

Cela confirme que les canaux KC_a et plus particulièrement les canaux BK_{Ca} semblent jouer un rôle dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire et que les activer pourrait être une stratégie intéressante afin de réduire l'HTAP.

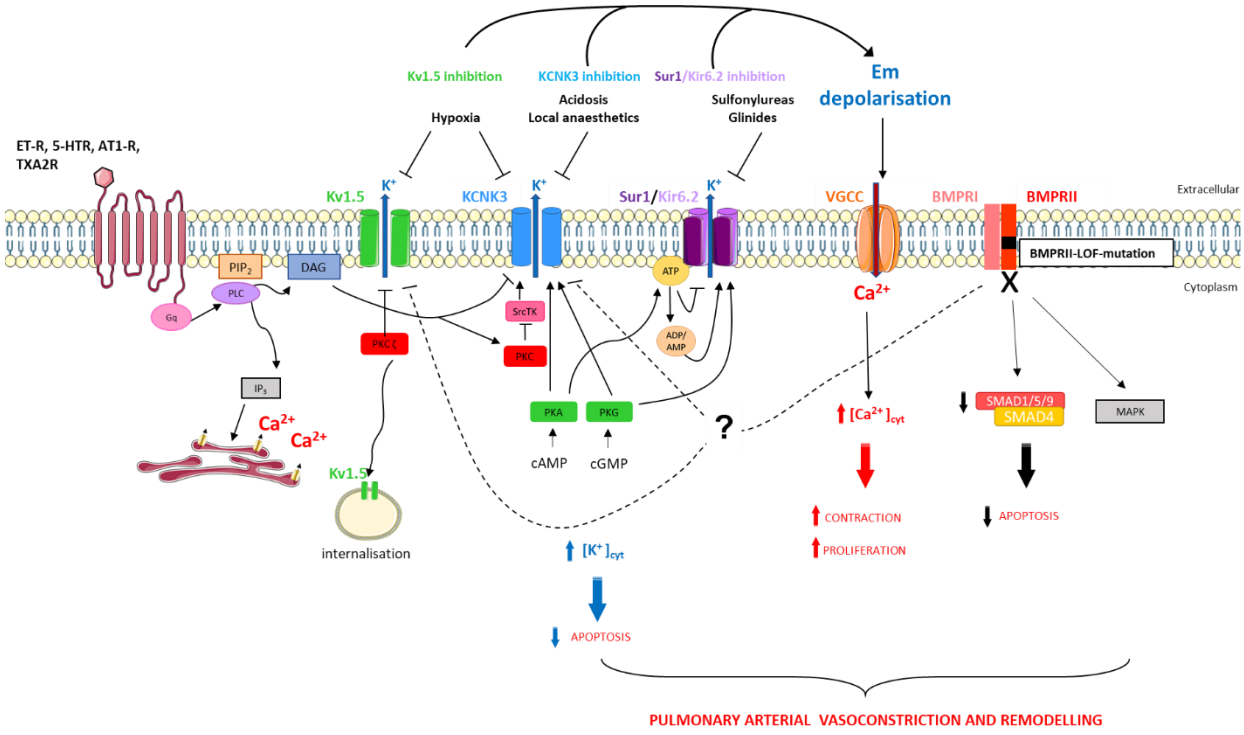


Figure 33 Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la régulation des canaux K^+ dans les CML-APs dans le contexte de l'HTAP (Le Ribeuz et al. 2020)

6. Les traitements de l'HTAP

Actuellement, 5 classes de molécules sont autorisées pour le traitement de l'HTAP qui permettent de cibler trois grandes voies centrales dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire : La voie de la prostacycline, la voie de l'endotheline et la voie du monoxyde d'azote (Figure 34).

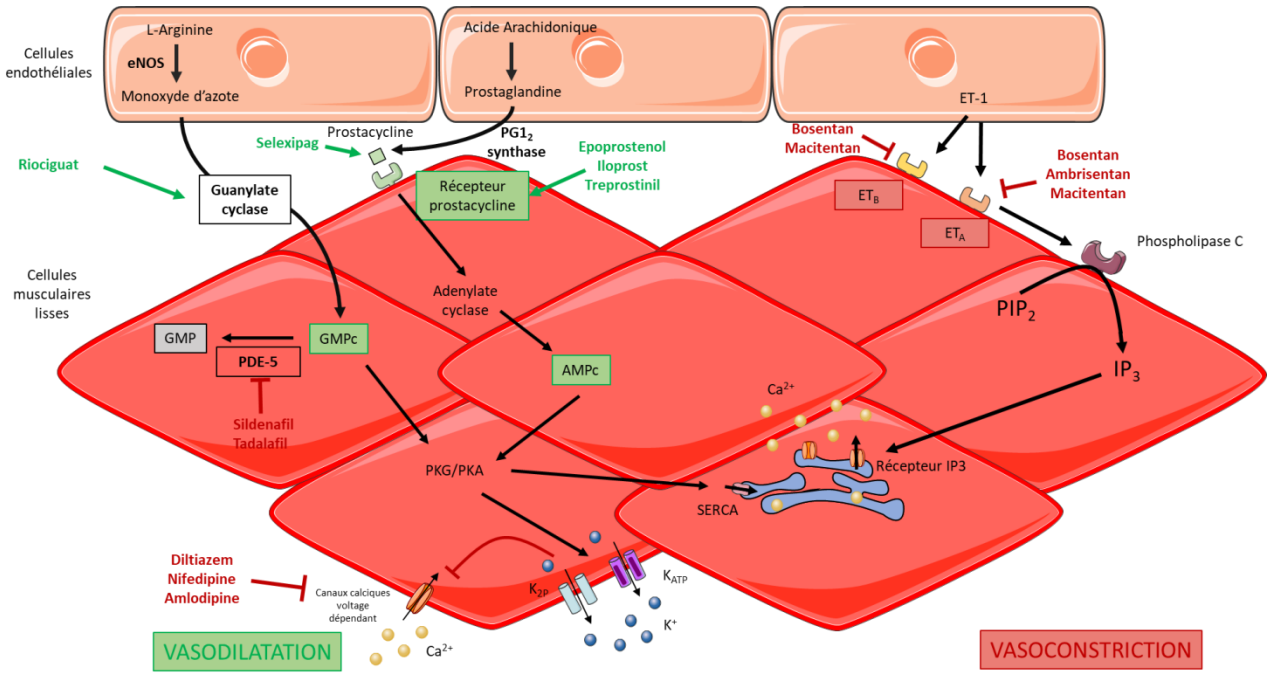


Figure 34 Schéma représentatif des principales voies ciblées par les traitements actuels de l'HTAP

6.1.La voie de la prostacycline

Comme décrit précédemment, les CEs (partie 5.4.2.2) produisent de la prostacycline (ou prostaglandine I_2, PGI_2) via l'acide arachidonique. Plusieurs études ont décrit que la production de prostacyline chez les patients atteints d'HTAP est diminuée, notamment car l'expression de la prostacycline synthase est réduite dans les poumons de patients atteints d'HTAP (Christman et al. 1992; Tuder et al. 1999).

Les analogues de la prostacycline utilisés comme traitement de l'HTAP vont venir activer la production d'AMPc ce qui va entrainer une relaxation des artères pulmonaires.

Le premier médicament utilisé a été l'epoprosténol. C'est le premier et unique médicament qui dans les années 1990 a permis de montrer une diminution de la mortalité dans une cohorte de patients atteints d'HTAPi (L. J. Rubin et al. 1990) . C'est un analogue synthétique de la prostacycline endogène. Son principal point faible est sa demi-vie qui est de 3 à 6 minutes. Ainsi, cela entraine la prise de ce médicament par voie intraveineuse continue via un cathéter. Plusieurs effets secondaires ont été observés tel que des migraines, diarrhées, nausées et des complications liées au mode d'administration, thrombose, infection au site du cathéter et l'interruption de la perfusion qui est une urgence médicale.

Le treprostinil est le deuxième analogue de la prostacycline utilisé, dont la demi-vie a été allongée de 3 à 5 heures. Plusieurs voies d'administration ont été proposées, mais à l'heure actuelle seule l'administration en sous-cutané est utilisée. Le treprostinil tout comme l'époprostenol va entrainer une augmentation de l'AMPc intracellulaire qui est associée avec l'ouverture des canaux K_{Ca} ce qui entraine une hyperpolarization de la membrane des CML-APs, la fermeture des CCVD et donc une relaxation des artères. Une étude a également montré que le treprostinil peut activer le canal KCNK3/TASK-1 dans les CMLs-AP humaines via la phosphorylation de la PKA, ce qui montre que KCNK3 peut jouer un rôle dans la relaxation des APs par le treprostinil. Les effets secondaires retrouvés par l'administration du treprostinil sont des migraines, des douleurs à la mâchoire et des douleurs au site d'injection (Picken et al. 2019). Une récente étude a mis en évidence que le treprostinil inhibe les canaux TREK-1 et TREK-2, des canaux potassiques K2P impliqués dans les voies de perception de la douleur (Cunningham et al. 2021). TREK-1 et TREK-2 sont très exprimés au niveau des neurones sensoriels, cette inhibition de ces canaux par le treprostinil pourrait expliquer les migraines retrouvées chez les patients traités avec cette molécule.

Le dernier analogue de la prostacycline utilisé est l'iloprost. Il s'utilise par inhalation et a démontré une amélioration des paramètres hémodynamiques des patients. Néanmoins sa durée de vie étant de 30 à 60 minutes cela implique de pratiquer des inhalations 6 à 9 fois par jour. Le traitement existe aussi par administration en intraveineuse et a révélé des effets similaires. Ce mode d'administration est plutôt réservé aux patients souffrant d'ulcères digitaux évolutifs comme dans la maladie de Raynaud (H. Olschewski et al. 2002).

Le dernier médicament ciblant la voie de la prostacycline est l'agoniste sélectif du récepteur de la prostacycline (IP) appelé sélexipag. Le sélexipag va uniquement cibler le récepteur IP de la prostacycline et il a été montré qu'il peut entrainer la relaxation des APs de rats (Kuwano et al. 2008). Sa forte spécificité pour le récepteur de la prostacycline permet de diminuer la survenue d'effets secondaires comparés aux analogues de la prostacycline, moins spécifiques. Le sélexipag est rapidement métabolisé, et son métabolite actif est le ACT-333679 et est 37 fois plus puissant que le sélexipag avec une demi-vie moyenne de 8 à 14 heures (Bruderer et al. 2014). Il est administré par voie orale, deux fois par jour. Néanmoins plusieurs effets indésirables ont été signalé tel que des nausées, diarrhée, toux et douleurs à la mâchoire. En 2017, l'agence européenne du médicament a été saisie pour évaluer les risques du sélexipag suite à cinq décès en France après l'initiation du traitement avec cette molécule (Sitbon et al.

2015). Après analyse, le comité européen des risques en matière de pharmacovigilance (PRAC) a conclu que l'utilisation du sélexipag ne suggère pas de surmortalité comparativement aux autres traitements utilisés par voie orale dans le traitement de l'HTAP. À l'heure actuelle, aucune mesure réglementaire spécifique n'a été jugée nécessaire, et la sécurité du sélexipag continue d'être surveillée.

6.2. La voie de l'endotheline

Les médicaments ciblant cette voie sont des antagonistes des récepteurs à l'endothéline1 (ARE). C'est la première classe de médicaments oraux à avoir été mise sur le marché pour le traitement de l'HTAP, avec le bosentan en 2000 (Lewis J. Rubin et al. 2002). Le bosentan va se lier avec une forte affinité sur les deux isoformes des récepteurs à l'endotheline1, ET_A et ET_B. Le bosentan est métabolisé au niveau du foie par le cytochrome P450 et va produire 3 métabolites dont le principal est le Ro 48-5033. Le bosentan est par ailleurs un inhibiteur de certains transporteurs hépatobiliaires ce qui pourrait être à l'origine de son hépatotoxicité, réversible après l'arrêt du traitement.

L'ambrisentan est spécifique du récepteurs ET_A et a une demi-vie plus longue que le bosentan et n'entraine pas de dysfonction du foie (Galiè et al. 2008). Néanmoins, l'ambrisentan n'a pas montré une efficacité de traitement meilleure que le bosentan. Le sitaxentan fonctionnant comme l'ambrisentan a quant à lui était retiré du marché depuis 2010 suite à de trop gros risques d'hepatotoxicité.

Le macitentan est le dernier ARE approuvé pour le traitement de l'HTAP (Iglarz et al. 2008), il cible les deux récepteurs de l'ET-1 comme le bosentan. Il a été développé par modification de la structure du bosentan pour permettre une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires. L'essai SERAPHIN a démontré que cette molécule permettait une réduction significative de la mortalité et de la progression de la maladie (Pulido et al. 2013).

6.3. La voie du monoxyde d'azote

6.3.1. Les inhibiteurs des PDE5

Le mécanisme d'action de ces molécules est d'empêcher le fonctionnement de l'enzyme phospohdiesterase 5, ce qui va permettre au GMPc de ne pas être hydrolysé. Le GMPc est le second messager de la voie du NO et permet la relaxation des CML-APs notamment via l'activation de la PKA et PKG. La première molécule utilisée dans le traitement de l'HTAP est

le sildénafil. En addition avec l'effet vasorelaxant, il permet également d'augmenter la contractilité du VD, ce qui réduit la post-charge et augmente le débit cardiaque. Le sildénafil permet une amélioration du test de marche et des paramètres hémodynamiques des patients (Galiè et al. 2005). Le tadalafil est structuralement différent du sildénafil et sa demi-vie plus longue permet une prise une seule fois par jour comparé à trois pour le sildénafil (Galiè et al. 2009).

6.3.2. Les activateurs de la guanylate cyclase soluble (sGC)

Le seul activateur de la GC mis sur le marché est le riociguat. Il permet de stabiliser la liaison NO-sGC et peut aussi stimuler directement la sGC, ce qui permet une augmentation intracellulaire du GMPc. Le riociguat est donné aux patients atteints d'HTAP ainsi qu'aux patients souffrant de CTEPH inopérable. Le riociguat améliore la capacité d'exercice des patients et retarde la dégradation de la maladie (Ghofrani et al. 2013).

6.4. Les bloqueurs de canaux calciques

Ce traitement est prescrit uniquement aux patients atteints d'HTAP et qui sont répondeurs au test de vasoréactivité (inhalation de NO) (voir partie 2.4.5). Cela concerne environ 10% des patients atteints d'HTAP. Ces patients vont alors avoir un bon diagnostic, leurs traitements sont des inhibiteurs des CCVD tels que le diltiazem, le nifedipine ou l'amlodipine.

6.5. Molécules en cours d'essais cliniques

Bien que différents traitements existent dans l'HTAP comme décrit précédemment, aucun n'est curatif. Ils permettent de retarder l'aggravation de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients sur le court et moyen terme. Néanmoins, la plupart des patients vont avoir recours à la greffe pulmonaire (pour les patients éligibles). C'est pour cela que de nombreux essais cliniques sont toujours en cours pour pouvoir améliorer la prise en charge et le traitement de patients atteints d'HTAP, dans le but de trouver des thérapies pouvant éviter la transplantation pulmonaire.

Tacrolimus : Ce médicament est connu pour être un immunosuppresseur et est donné aux patients transplantés par allogreffe. Le tacrolimus interagit avec la protéine FKB12 qui peut inhiber la calcineurine et NF-ATc. Il a été démontré que la protéine FKB12 ciblée par le tacrolimus peut interagir avec les 3 récepteurs BMP de type 1 (ALK1, ALK2, ALK3) qui vont alors se lier avec BMPR2 et activer cette voie. Les auteurs ont ensuite démontré que le

tacrolimus diminue la dysfonction endothéliale dans l'HTAP (Spiekerkoetter et al. 2013). Suite à cette publication, un essai clinique de phase II a été réalisé en administrant aux patients du tacrolimus ou un placebo. La molécule a été bien tolérée chez les patients, n'a pas engendré de graves effets secondaires et une augmentation de l'ARNm de BMPR2 a été observée chez les patients traités, néanmoins les résultats observés tels que des améliorations du test de marche ou des paramètres hémodynamiques n'étaient pas significativement différents de patients ayant reçu le placebo Spiekerkoetter et al. 2017).

Sotatercept : Une dérégulation de la balance des voies dépendantes de BMPR2 et de TGF-β est observée dans l'HTAP. Le sotatercept est une protéine de fusion de classe 1 composée du domaine extracellulaire du récepteur de type IIA de l'activine humaine fusionnée avec le domaine Fc de l'immunoglobuline G1 humaine. Le sotatercept fonctionne comme un piège à ligand qui a une grande affinité avec plusieurs molécules de la voie du TGF-β comme les activines et les BMPs, substrat des récepteurs ALK4/5/7-ActIIA/B acteurs de la voie pro prolifération de cette famille. Cela va donc permettre de restaurer l'expression de la voie du BMPR2 en rééquilibrant la balance entre ces deux grandes voies. L'essai clinique PULSAR de phase II a mis en évidence une diminution des résistances vasculaires pulmonaires liée à la diminution des PAPm. Le principal effet secondaire est une thrombocytopenie qui a pu être reversée après retard, diminution ou arrêt du traitement. L'étude est très encourageante est un essai clinique de phase III est en cours (Marc Humbert et al. 2021).

Tocilizumab : C'est un traitement donné notamment dans la polyarthrite rhumatoïde et qui est un anticorps monoclonal ciblant le récepteur de l'IL-6. De nombreuses études ont mis en évidence une forte augmentation de l'IL-6 durant le développement de l'HTAP (sérum et poumon de patients atteints d'HTAP et rats MCT). L'essai clinique de phase II étudiant cette molécule dans le cadre de l'HTAP a démontré une bonne amélioration de la capacité physique et des résistances vasculaires chez les patients ayant reçu le traitement. Le nombre insuffisant de patients traités ne permet pas de conclure sur l'efficacité potentielle de ce nouveau traitement et un nouvel essai clinique à plus grande échelle est attendu (Hernández-Sánchez et al. 2018; Toshner et al. 2021)

Bardoxolone : Beaucoup de processus inflammatoires et immunitaires sont sous le contrôle du facteur de transcription nucléaire NF-κB. Le bardoxolone bloque le facteur NF-κB en régulant positivement Nrf2, un facteur anti-inflammatoire. Un essai clinique de phase II a démontré une amélioration significative du test de marche des patients traités au

bardoxolone (Oudiz et al. 2015). Un essai clinique de phase III vient de se finir et les résultats sont en cours d'analyse.

À l'heure actuelle, une trentaine d'essais cliniques sont en cours pour le traitement de l'HTAP et ciblent différentes voies qui sont connues pour être dérégulées pendant le développement de l'HTAP :

Thérapies ciblant la voie du BMPR2 : Tacrolimus, chloroquine et hydroxychloroquine, Sotatercept

Thérapies ciblant l'inflammation et l'immunité : Tocilizumab (IL-6), Anakinra (IL-1), Etanercept (TNF-α), Bardoxolone et dimethyl fumarate (NF-κB), Rituximab (lymphocytes B).

Thérapies ciblant les facteurs de croissance et tyrosine kinases : Imatinib, sorafenib, nilotinib

Thérapies ciblant la voie Rho/ROCK : Fasudil

Thérapies ciblant la dysfonction mitochondriale : Dichloroacetate (activateur pyruvate déhydrogénase), Selonsertib (inhibiteur ASK1), Ranolazine et Trimetazidine (activateur de l'oxydation du glucose)

Thérapies ciblant le stress oxydant : Nitrite NO_2^- , CoenzymeQ10 (antioxydant)

Thérapies ciblant le métabolisme : Metformin

Thérapies ciblant la voie neurohormonal : Carvedilol (activation du système nerveux sympathique), ACE2 (Activation RAAS), Spironolactone (antagonsite de l'aldostérone)

Thérapie avec des facteurs vasodilatateurs : VIP (peptide intestinal vasoactif)

Thérapies ciblant la voie de la sérotonine : Escitalopram et Fluoxetine (inhibiteurs serotonine)

Thérapies ciblant la voie de signalisation des œstrogènes : Anastrozole (agent anti oestrogène), Tamoxifen (inhibiteurs des récepteurs aux oestrogènes), Fluvestran

Thérapies ciblant la déficience en Fer : Fer inject (ferric carboxymaltose), FeSO4 (sulfate de Fer)

Thérapie ciblant les dommages à l'ADN : Olaparib (inhibiteur de PARP-1)

6.6. Les thérapies géniques

Les récentes innovations en termes de thérapies géniques qui permettent de pouvoir réprimer ou réexprimer certains gènes dysfonctionnels dans des pathologies ont ouvert la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques dans l'HTAP. Plusieurs technologies existent, des

techniques associées à l'administration de virus, lentivirus, adenovirus ou virus adeno associé (AAV).

6.6.1. Kv1.5

La nébulisation en intratrachéal d'un adénovirus contenant KCNA5, le gène codant pour le canal potassique Kv1.5, a montré une amélioration du débit cardiaque et des résistances vasculaires pulmonaires de rats exposés à l'hypoxie chronique (Pozeg et al. 2003).

6.6.2. HIF1-α

Un lentivrus délivrant un shRNA de HIF1-α par nébulisation intratrachéale a permis de normaliser l'expression de HIF1-α dans les artères pulmonaires ainsi que l'atténuation de l'augmentation de la PAPm et de la muscularisation des APs dans le modèle de rats exposés à l'hypoxie chronique (Ying Li et al. 2016).

Dans les modèles pré-cliniques d'HTAP, plusieurs études ont montré l'efficacité d'une thérapie génique afin de corriger les expressions par siRNA ou plasmide exprimé dans un vecteur viral (Rai et al. 2021). Néanmoins, cette technique reste limitée du fait de la forte réaction inflammatoire qu'elle entraine. La technologie plus récente de l'AAV semble pouvoir limiter cet effet néfaste et a également était testé dans des animaux modèles d'HTP (Zolty 2021). À l'heure actuelle, il n'y a pas d'essais cliniques en cours utilisant des thérapies géniques dans l'HTAP.

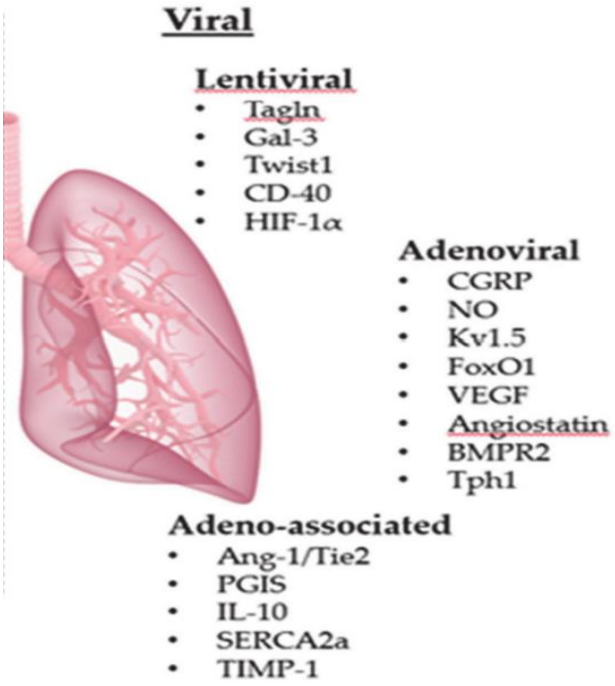


Figure 35 Représentation des différentes thérapies géniques expérimentées dans les modèles animaux d'HTP (Rai et al. 2021)

6.7. Molécules ciblant les canaux potassiques

Comme décrit précédemment (partie 5.7.2) plusieurs activateurs non spécifiques des KATP ont été testés dans des modèles animaux d'HTAP et ont permis d'améliorer les paramètres hémodynamiques.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à déterminer le rôle des canaux KATP SUR1/Kir6.2 et SUR2/Kir6.1 dans la physiopathologie de l'HTAP notamment par des expériences *in vivo* sur plusieurs modèles animaux d'HTP, afin de connaitre le potentiel thérapeutique des canaux KATP dans le contexte de l'HTAP.

7. Les modèles animaux d'HTAP

Plusieurs modèles ont été décrits comme pouvant mimer le développement et certaines caractéristiques de l'HTAP, c'est pourquoi ils sont plutôt des modèles d'hypertension pulmonaire au sens large (HTP). La plupart sont réalisés chez le rat ou la souris. Néanmoins, il existe aussi des modèles chez de plus gros animaux tel que le porc ou le mouton.

7.1. Modèle monocrotaline (MCT)

La monocrotaline est un alcaloide pyrrolizidine qui provient d'une plante : la *Crotalaria spectabilis.* La MCT va être transformée en MCT pyrrole (MCTP) au niveau du foie par le cytochrome P-450 qui est la substance active (Sztuka et Jasińska-Stroschein 2017). L'injection de MCT chez la souris n'a pas permis le développement d'une HTP (pas de remodelage vasculaire ni d'hypertrophie du VD) malgré une dysfonction endothéliale et la présence d'une forte inflammation pulmonaire (Molteni et al. 1989). La MCT est injectée en une unique dose à 60mg/kg en sous cutanée chez le rat. Dès 21 jours suite à l'injection de MCT il est observé un fort remodelage des petites artères pulmonaires, une augmentation de la pression des APs, une forte inflammation, une hypertrophie du VD et une insuffisance cardiaque droite. Néanmoins, il a été observé que dès 7 à 14 jours après l'injection de MCT, les pressions systoliques dans le VD sont déjà augmentées et le remodelage vasculaire pulmonaire est déjà présent. De plus, la perte d'expression et de fonctions de certains canaux potassiques comme KCNK3/TASK1 a été identifiée dès 7 jours après l'injection de MCT (Antigny et al. 2016).

Le mécanisme exact du développement de l'HTP par la MCT n'est pas connu, mais l'on observe assez tôt des dommages de l'endothélium vasculaire pulmonaire ce qui peut être l'élément déclencheur de la progression de l'HTP.

Certaines études reportent les limites de ce modèle notamment par le fait que les veines pulmonaires peuvent être également atteintes. On retrouve également des dommages au foie et au rein (Roth et al. 1981).

7.2. Modèle d'Hypoxie chronique chez le rat ou la souris

Le lien entre hypoxie et développement d'une HTP a été mis en évidence depuis plusieurs décennies, avec un développement plus important d'HTP dans des populations vivant à haute altitude. Depuis, plusieurs pathologies pulmonaires chroniques comme la fibrose pulmonaire, la BPCO, l'apnée du sommeil et des pathologies comprenant une hypoxie alvéolaire ont été

liées avec un développement favorisé d'une HTP hypoxique (Groupe 3 de la classification des HTP). C'est pourquoi le modèle d'hypoxie chronique chez le rongeur est un modèle très utilisé pour étudier l'HTP et notamment les HTPs du groupe 3 (voir partie 2.2.3). De plus, ce modèle a une bonne reproductibilité (Dignam et al. 2021). Les animaux sont placés pendant 3 ou 4 semaines dans une chambre à 10% d'O_2 (environnement normoobare) et cela permet d'observer une augmentation de la PAPm et un important remodelage vasculaire pulmonaire (West et Hemnes 2011). Il a aussi été observé une augmentation de l'inflammation périvasculaire pulmonaire et un recrutement de cellules inflammatoires (Burke et al. 2009). Ce modèle est plutôt bien toléré chez le rat ou la souris avec quasiment pas de mortalité et correspond à un modèle moins sévère que le modèle MCT. Ce modèle peut être réversible en quelques semaines après un retour dans un environnement normoxique.

7.3. Modèle d'hypoxie chronique + injection de sugen

Ce modèle a été créé afin d'obtenir un modèle sévère d'HTAP en combinant l'hypoxie chronique d'une part avec l'injection d'un inhibiteur au récepteur VEGFR-2, le sugen (SU5416) (Taraseviciene-Stewart et al. 2001). Le protocole le plus utilisé et l'injection unique de sugen a 20/mg/kg et la mise en hypoxie des rats pendant 3 à 4 semaines suivies d'une période de normoxie de 2 à 3 semaines. Le VEGFR-2 est impliqué dans la survie des CEs, c'est pourquoi ce traitement initie une mort cellulaire des CE-APs. Les CEs restantes sont dites résistantes à l'apoptose et acquiert un phénotype pro-prolifératif. Dans ce modèle on observe un très fort remodelage vasculaire pulmonaire avec l'apparition des lésions intimales proches des lésions plexiformes retrouvées chez l'homme (Abe et al. 2010). On observe également dans ce modèle une très forte augmentation de la PAPm vers 45-50 mmHg. De plus, une défaillance cardiaque droite est observée dès 6 semaines après exposition au sugen avec la réduction du débit cardiaque et un index de Fulton au-delà de 0.75 (Bogaard et al. 2009). Comme décrit précedemment (partie 5.3.1.1) une étude a démontré que l'utilisation d'un inhibiteur plus spécifique du VEGFR2 dans un modèle de rats en hypoxie chronique n'entraine pas d'augmentation des PAPm (Sitapara, Sugarragchaa, et Zisman 2021).

7.4. Modèle de cerclage de l'artère pulmonaire

Ce modèle a été initialement décrit comme une opération chirurgicale chez des enfants nés avec des défauts cardiaques tels qu'une dérivation du flux sanguin gauche-droite induisant

une circulation dans l'AP anormalement grande. Depuis, cette technique est devenue un modèle qui entraine assez rapidement une augmentation des pressions dans VD sans remodelage vasculaire pulmonaire (LekanneDeprez et al. 1998). Ce modèle permet de mieux analyser l'effet cardioprotecteur de certaines molécules que dans les autres modèles où la dysfonction vasculaire pulmonaire peut moduler la dysfonction cardiaque et la réponse de certaines molécules (Borgdorff et al. 2013).

7.5. Modèle de pneumectomie associé à la MCT ou au sugen

Le principe de ce modèle est de réaliser une lobectomie du poumon gauche chez le rat qui induit premièrement une augmentation des pressions vasculaires pulmonaires dans le poumon restant, ainsi qu'un remodelage vasculaire pulmonaire. Il est ensuite réalisé un « second hit » par la MCT ou le sugen une semaine après l'opération de pneumectomie. Ce « second hit » va notamment permettre le développement d'une dysfonction endothéliale ainsi qu'une augmentation de la sévérité des paramètres hémodynamiques. Ce modèle est très sévère, ou 21 jours après l'injection de MCT ou de sugen les rats présentent une forte augmentation des PAPm (Katz et al. 2019).

Matériel et méthode

1. Modèles animaux utilisés

Plusieurs modèles animaux d'HTP ont été utilisés pendant ma thèse :

HTP induite par la monocrotaline (MCT)

La MCT est dissoute dans 1N d'HCL puis tamponnée avec 1N de NaOH. Une injection de MCT à 60 mg par kg de 500µL en sous-cutanée est réalisée sur des rats wistar de 100g et il est injecté le même volume de sérum physiologique aux rats contrôles.

- ⇨ Protocole de traitement préventif au diazoxide et au pinacidil

Les rats ont été séparés en trois groupes au hasard, un groupe de rats contrôles traités à J0 avec de la solution saline, un groupe traité à J0 avec de la MCT puis injecté au DMSO en intrapéritonéal (IP) pendant 21 jours et un groupe traité à J0 avec de la MCT puis injecté avec du diazoxide en IP à 20 mg/kg/jour ou du pinacidil (1mg/kg/jour) pendant 21 jours.

- ⇨ Protocole de traitement curatif au diazoxide, au pinacidil ou au NN414

Les rats ont été séparés en trois groupes au hasard, un groupe de rats contrôles traités à J0 avec de la solution saline, un groupe traité à J0 avec de la MCT puis injecté au DMSO en IP pendant 7 jours de J14 à J21 et un groupe traité à J0 avec de la MCT puis injecté avec du diazoxide (20 mg/kg/jour) ou du pinacidil (1mg/kg/jours) ou du NN414 (1.5mg/kg/2x/jour) en IP pendant 7 jours de J14 0 J21.

HTP induite par l'hypoxie chronique

Les rats sont placés de J0 à j21 dans des chambres à hypoxie normobare en présence de 10% de O_2, les rats contrôles, dit normoxie sont placés dans la même pièce, hors de la chambre.

- ⇨ Protocole de traitement préventif au diazoxide

Les rats ont été séparés en trois groupes au hasard. Un groupe de rats normoxie, un groupe placé en hypoxie et traités pendant 21 jours avec une injection en IP de DMSO et un groupe placé en hypoxie et traités pendant 21 jours avec une injection IP de diazoxide.

- ⇨ Protocole de traitement curatif au diazoxide

Les rats sont séparés en trois groupes au hasard. Un groupe de rats normoxie, un groupe placé en hypoxie et traités pendant 7 jours de J14 à J21 avec une injection en IP de DMSO et un groupe placé en hypoxie et traités pendant 7 jours de J14 à J21 avec une injection IP de diazoxide.

Traitement de rats au diazoxide ou pinacidil

Deux groupes de rats ont été réalisés au hasard, un groupe injecté au DMSO en IP pendant 21 jours et un groupe de rats traité au diazoxide ou au pinacidil pendant 21 jours.

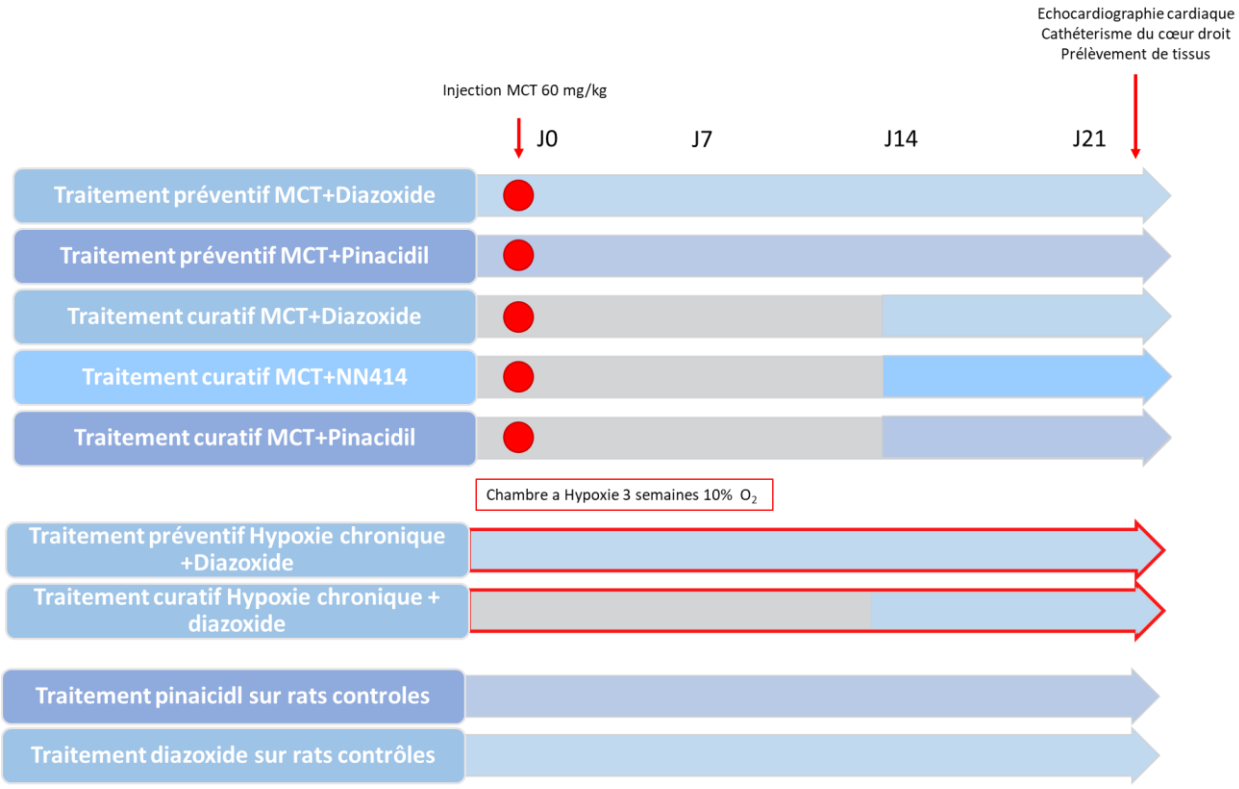


Figure 36 Schéma des différents modèles animaux utilisés au cours de ma thèse

2. Échocardiographie

L'analyse échocardiographique de nos différents modèles de rats a été réalisée par le Dr Angèle Böet. Les rats sont anesthésiés à l'isoflurane (5% puis 2% pendant l'expérimentation). Plusieurs paramètres ont été mesurés et analysés avec l'échographe Vivid E9 (GE Healthcare) :

- Fréquence cardiaque (Heart Rate HR))
- Le diamètre de l'Artère pulmonaire (cm)
- Pulmonary Artery Accelaration Time (PAAT), qui est un reflet des resistances vasculaires pulmonaires.
- Velocity Time Integral (VTI) qui est le reflet du flux sanguin.
- Stroke Volume (SV) calculé ave la formule :

$$SV = (\frac{(diam\ AP)^2}{4})*\text{ITV}$$

Cela correspond au volume d'éjection systolique (ml).

- RV et LV thickness, ce qui correspond à l'épaisseur du VD et VG.
- RV End Diastolic Diameter (RVEDD) et LV End Diastolic Diameter (LVEDD) qui correspondent au diamètre du VD et VG pendant la diastole.
- RV End Systolic Diameter (RVESD) et LV End Systolic Diameter (LVESD) qui correspondent au diamètre du VD et VG pendant la systole.
- RV Fractionnal shortening (RV FS) et LV Fractionnal Shortening (LV FS) ce paramètre montre le pourcentage de modification du diamètre du VD et du VG entre la diastole et la systole. Ils sont calculés selon les formules :

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

3. Mesures hémodynamiques

Afin de mesurer l'impact des différents traitements réalisés, des cathétérismes cardiaque droit ontété effectués. Les rats sont endormis sous isoflurane (5% pour l'initiation et 3% pendant l'expérimentation). La zone thoracique supérieure est ouverte afin d'accéder à l'artère carotide gauche et la veine jugulaire droite. Une sonde thermique est insérée dans la carotide et un cathéter ombilical légèrement courbé est inséré dans la veine jugulaire. Ce cathéter est relié à un capteur de pression. Ce cathéter est ensuite poussé vers l'oreillette droite puis par rotation et mouvement de poussée, le cathéter est introduit dans le VD. Ceci est contrôlé en vérifiant et visualisant le signal de pression émis par le capteur de pression connecté avec le logiciel LabChart. Les pressions sanguines du VD sont alors mesurées. Le débit cardiaque est ensuite mesuré par thermodilution : on injecte un volume fixe (250µl) de sérum physiologique entre 1 et 3°C dans le VD, puis on mesure l'évolution de la température du sang au niveau de la carotide par la sonde thermique. Plus le débit sera faible, plus la température mesurée mettra de temps à revenir à une température normale et c'est l'aire sous la courbe de variation de température qui permet de mesurer la valeur de débit cardiaque. Enfin les pressions systémiques sont mesurées en plaçant le cathéter dans la carotide gauche à la place de la sonde thermique.

4. Prélèvement des organes

Après l'analyse des paramètres hémodynamiques, les rats sont sacrifiés par exsanguination sous anesthésie profonde. Ceci permet de vider les animaux de leur sang et notamment les poumons, ce qui améliorera la qualité des coupes histologiques. Dans un premier temps, après l'ouverture de la cage thoracique, le cœur est prélevé et placé dans du sérum physiologique. Ensuite le lobe de poumon gauche est récupéré après avoir été ligaturé et va être immédiatement congelé dans de la carboglace ou de l'azote liquide et sera utilisé par la suite pour des études d'expression génique ou protéique. Une canule est ensuite placée dans la trachée afin de gonfler les poumons avec un mélange moitié OCT (optimal cutting temperature) et moitié sérum physiologique. Une fois les poumons gonflés en mimant l'inspiration, un lobe est prélevé et placé dans du formaldéhyde 4%. Ce lobe de poumon fixé sera inclus dans de la paraffine pour réaliser des analyses histologiques. Ensuite le cœur est récupéré et l'index de Fulton est réalisé. On prélève les oreillettes et on élimine les différents vaisseaux puis on sépare le VD du VG + septum. On pèse les ventricules et oreillettes et l'Index de Fulton est calculé avec la formule : Poids du VD / Poids du VG + septum. Un morceau de VD et un morceau de VG sont ensuite prélevés puis placés dans le formaldehyde 4% et le reste des ventricules et des oreillettes est congelé. Pour finir, les tibias des rats peuvent être prélevés et mesurés pour normaliser le poids du cœur avec la taille du rat.

5. Myographe

Cette expérience permet de mesurer la contractilité d'un vaisseau isolé (*ex-vivo*) comme une artère ou une veine. Toutes les études de myographe ont été réalisées sur un myographe de Emka technologies composée de deux Emka bath de 4 cuves chacun.

Figure 37 Images d'un myographe EMKA technologies et zoom sur les mâchoires ou les vaisseaux sont positionnés

Les rats sont anesthésiés avec 5% d'isoflurane avec notre appareil d'anesthésie des rongeurs (minerve). Les rats sont exsanguinés puis le bloc cœur-poumon est récupéré. Le cœur est prélevé et le VD et VG+Septum sont séparés afin de mesurer l'index de Fulton. L'artère aorte est récupérée en la détachant délicatement de la colonne vertébrale. Le lobe droit des poumons est récupéré et placé dans du sérum physiologique à 4°C puis dans une boite de pétri avec une solution de Krebs (NaCl 119mM, KCl 4.7mM, $CaCl_2$ $(H_20)_2$ 2.5mM, MgSO4 $(H_2O)_7$ 1.17mM, KH_2PO_4 1.18mM, $NaHCO_3$ 25mM, Glucose 11mM). L'artère pulmonaire est disséquée en l'isolant de la veine pulmonaire et de la bronche et en la détachant du parenchyme pulmonaire. Une fois disséquée l'artère est coupée dans la longueur en petits anneaux d'environ 2mm de long. Sous la loupe binoculaire, deux fils de tungstène de 50µM de diamètre sont introduits dans la lumière du vaisseau et ces fils vont être attachés par des vis présentent sur les mâchoires où va se positionner le vaisseau et qui sont reliées à une vis micrométrique afin de modifier l'écartement de la lumière du vaisseau de manière très fine. Le support dans lequel se trouve la mâchoire et le vaisseau va alors venir se positionner sur le Emka bath où la cuve va pouvoir être remplie de KREBS à 37°C et bullée avec du carbogène (95% O_2, 5% CO_2). La mâchoire est également reliée à un transducteur sous forme de fil qui va être relié

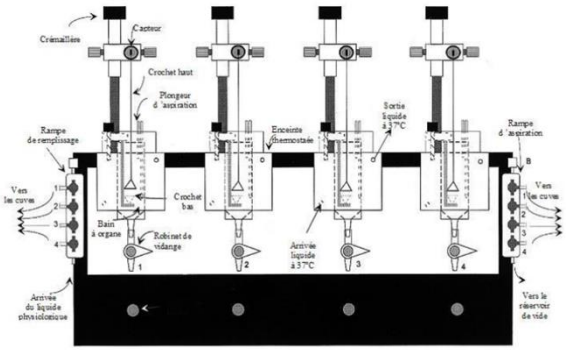


Figure 38 Schéma d'un EMKA bath en configuration organes isolés

au myographe et le signal après avoir été amplifié va être retranscrit via un logiciel d'analyse (logiciel IOX). Les cuves contiennent 5ml de KREBS.

Les expériences menées sur les aortes de rats et les APs humaines ont été réalisées avec les cuves d'organes isolés. Les anneaux artériels sont alors placés entre deux tiges en acier inoxydable, ce système se situe dans une cuve de plexiglass de 5ml. Les artères pulmonaires humaines et aorte de rats sont respectivement tendues à 0.6g et 1g.

Après avoir été montées entre les mâchoires et après que les cuves soient positionnées sur le EMKA bath, les artères vont être tendues grâce à la vis micrométrique jusqu'à 0.3g correspondant environ à une tension de 30 mmHg. On laisse les vaisseaux s'équilibrer pendant 30 à 45 minutes avant de réaliser une première stimulation en ajoutant 100 mM de KCL, ce qui va entrainer la contraction des vaisseaux et donner une indication sur leur état contractile. Après 45 minutes on obtient un plateau de contraction et les vaisseaux vont alors être rincés pour retrouver un état de contraction basal. Ensuite plusieurs expériences peuvent être réalisées. Des doses réponses croissantes de KCL ou U46619 (analogue du thromboxane A2) peuvent être réalisées afin de visualiser la contraction des vaisseaux en absence ou présence d'activateurs ou inhibiteurs d'intérêt (diazoxide, nateglinide, pinacidil).

Des doses réponses relaxation peuvent également être réalisées en pré-incubant les vaisseaux avec 1µM d'U46619 pour contracter les vaisseaux les doses réponses réalisées, l'ont étés avec de l'acétylcholine, du diazoxide, du pinacidil, du VU0071063 ou du NN414.

Les réponses de contraction et relaxation sont normalisées et exprimées en pourcentage par rapport à la valeur maximale ou minimale observée lors de la dose réponse.

6. Histologie

Toutes les analyses histologiques ont été réalisées à partir des tissus inclus dans de la paraffine et coupées à l'aide d'un microtome en sections de 4-5µm et mises sur lames de verre.

6.1. Coloration Hématoxylin-Eosine-Safran (HES)

Les coupes de poumons sont déparaffinées avec du Xylène, puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol puis d'eau. Les lames sont ensuite placées dans des bains d'hématéine, colorant cationique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement qui se fixent sur les acides nucléiques et colorent les noyaux en violet, puis d'éosine qui est un colorant anionique et va marquer le cytoplasme des cellules en rose. Enfin le safran va colorer les fibres de collagène en jaune-orange. Avec ces colorations, nous pouvons visualiser les

vaisseaux pulmonaires sur les lames et cela permet de mesurer le pourcentage d'obstruction des vaisseaux pulmonaires et analyser pour chaque vaisseau le diamètre total du vaisseau et le diamètre de la lumière du vaisseau. Les observations et analyses sont réalisées au microscope Nikon éclipse 60i.

6.2. Coloration rouge Sirius

Le marquage rouge Sirius permet d'analyser la fibrose cardiaque sur nos coupes histologiques de ventricule droit et gauche de rat. Ce marquage est réalisé grâce à l'expertise du laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital Marie Lannelongue. Des images sont ensuite prises au microscope EVOS et la fibrose est quantifiée grâce au logiciel ImageJ.

7. Immunomarquages

7.1. Immunomarquage fluorescent

Afin d'analyser la muscularisation des APs de rats, les lames de poumons sont déparaffinées, réhydratées puis démasquées à l'aide de l'appareil 2100 retriever et dans du tampon citrate à pH6. Les lames sont incubées avec du NH_4Cl, ce qui permet de saturer les groupements aldéhydes libres. Les lames sont ensuite saturées avec 0.1% de BSA, Triton 0.2%, 10% de sérum de rat et la quantité requise de PBS 1X. On incube ensuite toute la nuit les anticorps primaires dans un mélange PBS 1X + BSA 0.1%. Le lendemain après plusieurs lavages au PBS 1X les anticorps secondaires sont incubés 1h avec du DAPI au 1/10000. Après montage les lames peuvent ensuite être visualisées au confocal (LSM700, Carl Zeiss, Le Pecq, France).

7.1.1. Marquage VWF/α-SMA

Pour ces marquages les lames sont incubées toute la nuit avec les anticorps primaires VWF (1/400, anti rabbit, dako) et α-SMA-FITC (1/200, anti mouse sigma) et l'anticorps secondaire goat-anti-rabbit 594 (1/200 life tech). Pour l'analyse, sur chaque lames 100 vaisseaux sont classés soit non muscularisés (absence de α-SMA), soit partiellement muscularisés (présence partielle de α-SMA) ou totalement muscularisés (présence sur toute l'AP de α-SMA). Cela permet ensuite de connaitre pour chaque condition le pourcentage de vaisseaux non muscularisés et muscularisés.

7.1.2. Marquage EDU

L'EDU (5-éthynyl-2'-désoxyuridine, E10187, invitrogen) est une molécule permettant de visualiser la synthèse d'ADN et donc la prolifération cellulaire. L'EDU est injecté aux rats 24h avant le sacrifice (50µg/g). Pour détecter l'EDU incorporé et quantifier la prolifération, le protocole click-it reaction (C10340, invitrogen) est réalisé et permet de marquer les noyaux ou il y a eu incorporation d'EDU en rouge. Les lames sont également marquées avec l'α-SMA et le DAPI. Les lames sont observées et photographiées avec le microscope confocal (LSM700, Carl Zeiss, Le Pecq, France) et le logiciel Zen. L'analyse est réalisée avec le logiciel imageJ.

8. Culture cellulaire

8.1. Mise en culture de CML-AP humaine

Les CML-AP HTAP que nous avons au laboratoire proviennent des poumons explantés lors d'une transplantation pulmonaire de patients atteints d'HTAP et les CML-AP contrôles de tissus pulmonaires provenant de lobectomies réalisées sur des patients atteints de cancer du poumon et que nous utilisons comme des contrôles. Le prélévement pulmonaire si situe a distance de la tumeur.

Un morceau de poumon est récupéré et les APs sont disséquées. Les APs sont ensuite coupées en morceaux de quelques millimètres et le vaisseau est coupé dans le sens de la longueur et placé face lumière du vaisseau sur une plaque 6 puits avec du milieu DMEM supplémenté avec 15% de sérum de veau fétal (SVF), 2mM de L-Glutamine, 20mM d'HEPES, 10 ng/ml d'EGF, 0.1 mg/ml de streptomycine, 4.5g/L de D-glucose et 1X d'insuline-transferin-selenium. Les CML-APs vont migrer hors des APs et proliférer sur la surface de la plaque en 2-3 semaines. Après cela les cellules continuent d'être amplifiées sur T75 puis des ampoules de congélation sont réalisées avec 100µL de DMSO, 100µL de SVF et 800µL de CML-APs avec de DMEM (entre 500 000 et 1 000 000 de cellules). Les ampoules sont cryoconservées dans l'azote liquide.

8.2. Mise en culture de CE-AP humaine

Un prélèvement d'un lobe pulmonaire est récupéré et la plèvre est enlevée avant de réaliser une digestion enzymatique avec le morceau de poumon coupé en petits bouts avec de la Dispase (1.7U/mg). Après 2h d'agitation à 37°C, les poumons digérés sont filtrés avec un tamis cellulaire de 70µm puis lavés avec un mélange HBSS+SVF 10%. Après plusieurs centrifugations pour éliminer notamment les hématies, les cellules vont être placées dans des plaques 6 puits cotées avec de la gélatine à 0.1% et du milieu MCDB supplémenté avec 10% de SVF, 2mM de

L-Glutamine, 25mM d'HEPES, 10 ng/ml de VEGF, 6 µg/ml de ECGS, 0.1 mg/ml de streptomycine, 4.5g/L de D-glucose et 10U d'Héparine. Au fur et à mesure de la culture les hématies et cellules non adhérentes sont éliminées à l'aide de lavages au PBS 1X. Entre 7 à 10 jours après, les CE-APs vont être sélectionnées positivement avec un anticorps anti-CD31 couplé à des billes ferromagnétiques. Les CE vont être sélectionnées en étant isolées dans la suspension cellulaire avec un aimant. Les cellules étant maintenant CD31+ la culture est maintenue et les cellules sont amplifiées puis congelées de la même manière que les CML-APs.

8.3. Transfection des CML-APs et des CE-APs

Les cellules sont incubées dans un Eppendorf contenant 1ml d'optiMEM, 6µL de lipofectamine RNAimax et le siRNA siKCNK3 ou siContrôle à 100nmol/L pendant 20 minutes. On ajoute 200 µL de suspension cellulaire à ce mélange (environ $5x10^5$). Les cellules transfectées sont ensuite placées en boite de 35mm ou 60mm dans du milieu DMEM complet. L'efficacité du siRNA sera optimale entre 48h et 72h après la transfection.

8.4. Tests de prolifération des CML-APs et des CE-APs

Les cellules sont trypsinées et comptées avec des lames KOVA pour pouvoir les ensemencer dans des plaques 96 puits avec 5000 cellules/puit. Pour les CML-APs les cellules sont placées dans un milieu dépourvu de sérum et de facteurs de croissance pendant 48h afin de bloquer leur cycle cellulaire et de les synchroniser. Ensuite les cellules sont soit maintenues en 0% de SVF soit remises en condition 10% de SVF et elles sont traitées avec les différents agonistes testés (diazoxide, pinacidil) ainsi qu'avec du BrdU (Bromodesoxyuridine) pendant 24h.

Pour les CE-APs, la plaque 96 puits est cotée avec de la gélatine 0.1% au préalable et les cellules après ensemencement adhèrent pendant 24h dans du milieu MCDB complet. Ensuite les cellules sont traitées ou non avec de la cytosine arabinose à 1µM (inhibiteur du cycle cellulaire), avec les agonistes testés (diazoxide, pinacidil) et avec le BrdU pendant 24h.

Le BrdU est un analogue de la thymidine et va s'incorporer à l'ADN lors de la réplication des cellules. Nous utilisons le kit de prolifération cellulaire DELFIA inducer (perkin elmer).

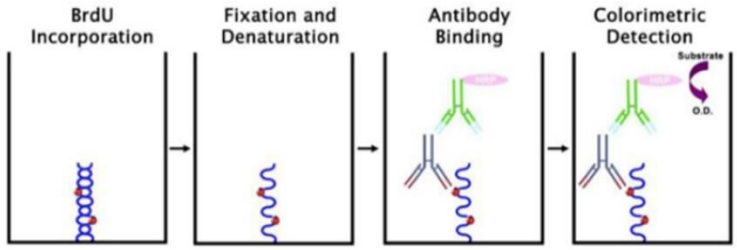


Figure 39 Schéma représentatif du test de prolifération cellulaire par incorporation de BrdU

Après fixation des cellules et ajout de l'anticorps anti-BrdU couplé à un fluorochrome, le taux de prolifération des cellules va être mesuré par l'intensité de fluorescence observée à 450 nm.

8.5. Test de migration des CML-APs et des CE-APs

Nous utilisons la technique de wound healing assay pour analyser la migration des cellules. Nous utilisons des inserts en silicone (IBIDI®) dans lesquels sont ensemencés $1x10^4$ CML-APs et $2x10^4$ CE-APs. Les cellules sont incubées 24h avec 1µM de cytosine arabinose pour bloquer la prolifération cellulaire et nous permettre d'observer uniquement la migration cellulaire. Les inserts sont ensuite retirés du milieu complet et les différents agonistes testés sont ajoutés (diazoxide, pinacidil). Des photos sont réalisées à différents temps pour visualiser l'évolution de la migration des cellules. (T15-T21 pour les CML-APs, T2-T8 pour les CE-APs).

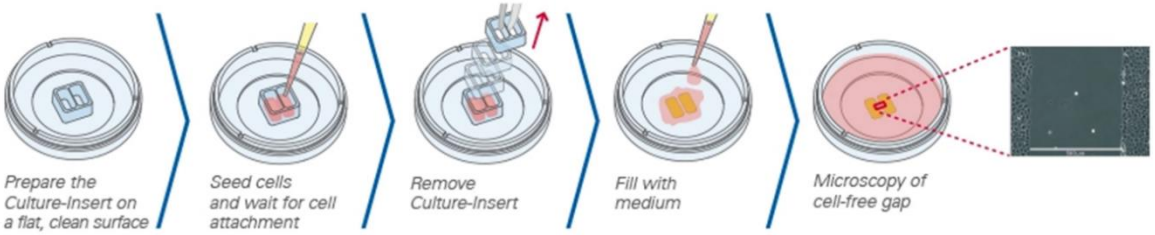


Figure 40 Schéma représentatif du test de migration par wound healing assay avec des inserts IBIDI©

8.6. Mesure du potentiel de membrane des mitochondries par la sonde TMRE

Les CML-APs sont mises en culture dans des boites à fond de verre. Elles sont traitées avec les différentes molécules testées ou siRNA. Les cellules sont ensuite mises en présence de la sonde TMRE (tetra-methylrhodamine éthyl) à 10nM pendant 1 minute. Les cellules sont ensuite rincées et la fluorescence est analysée au microscope confocal. La sonde TMRE va pénétrer dans les mitochondries. Elle est chargée positivement, elle peut donc s'accumuler dans les mitochondries chargées négativement, c'est-à-dire dont la membrane est hyperpolarisée. Ainsi, plus les membranes mitochondriales sont dépolarisées, moins le

marquage de la sonde TMRE sera intense. La sonde TMRE est excitée à 549nm et émet à 575nm.

9. Biologie Moléculaire

9.1. Expression protéique

9.1.1. Extraction protéique

Les protéines de poumons, de cœurs et APs de rats et humaines sont extraites ainsi que les CML-AP et CE-APs humaines pour étudier l'expression protéique par western blot.

Les lysats protéiques de ces différents échantillons sont préparés dans le tampon de lyse cellulaire suivant : IgPal 1%, Tris-HCl 20 nM, NaCl 137nM, Glycerol 10%, EDTA 2mM, Na2VO4 1mM, Aprotinine 10µg/ml, Leupeptine 10µg/ml et des anti phosphatases et antiprotéases). Ce lysat protéique est ensuite agité pendant 1h à 4°C puis centrifugé pendant 10 minutes à 10000rpm et le surnageant est récupéré.

Pour les tissus, ils sont broyés avec le tampon de lyse dans des tubes gentleMACS et à l'aide du gentlMACS dissociator puis agités 1h à 4°C, centrifugés 10 minutes à 10000rpm et le surnageant est récupéré. Une fois que les protéines sont extraites, on dose les échantillons avec la méthode BCA (BiCinchroninic acid assay).

9.1.2. Western blot

Les échantillons sont ensuite préparés pour le western blot, on prépare le dépôt pour 40µg de protéines pour les tissus et 20µg pour les cultures cellulaires auquel on ajoute du tampon Laemmli 2X et du β-mercaptoéthanol qui est un agent réducteur qui va permettre de dénaturer les protéines. Les échantillons sont chauffés 3 minutes à 94°C.

Les échantillons sont ensuite déposés ainsi qu'un marqueur de taille sur un gel précoulé de polyacrylamide avec un gradient 4%/15%. Le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse avec un tampon de migration (10% tris Glycine, 1% SDS 10%, eau qsp). La migration des protéines est réalisée à voltage constant 200V pendant 40 minutes. Ensuite les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans une cuve de transfert et avec un tampon 10% tris glycine, 20% d'éthanol 100% et eau qsp. Le transfert dure une heure à 100V. Après vérification de la présence des protéines avec du rouge ponceau, la membrane va être saturée afin de masquer les sites non spécifiques avec du PVA (Polyvynil alcohol 1X) pendant 3 minutes. Après 3 lavages de 5 minutes au TBS-T (10% de TBS 10X (pour 1L 60.5g de tris, 87.6g de NaCl, eau qsp en ajustant le pH a 7.6), 0.1% de tween 20 et eau qsp) les membranes sont

incubées avec l'anticorps primaire reconnaissant notre protéine d'intérêt. L'anticorps primaire est dilué selon les recommandations du fournisseur dans de la BSA 5% + TBS-T. L'incubation est réalisée pendant la nuit, le lendemain, trois lavages TBS-T sont réalisés puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé HRP (peroxydase) qui reconnait l'espèce de l'anticorps primaire pour se fixer dessus et dilué dans le lait 5% + TBS-T pendant une heure à température ambiante.

Pour la révélation des protéines, de l'ECL (enhanced chemiluminescent) est déposé sur la membrane. La chimiluminescence est mesurée par le transilluminateur ChemiDoc. La quantité de protéine révélée est proportionnelle à l'intensité de la bande révélée. La protéine β-actine est révélée sur tous les westerns blot comme témoin de charge et chaque protéine révélée est donc normalisée avec l'intensité de la β-actine correspondante.

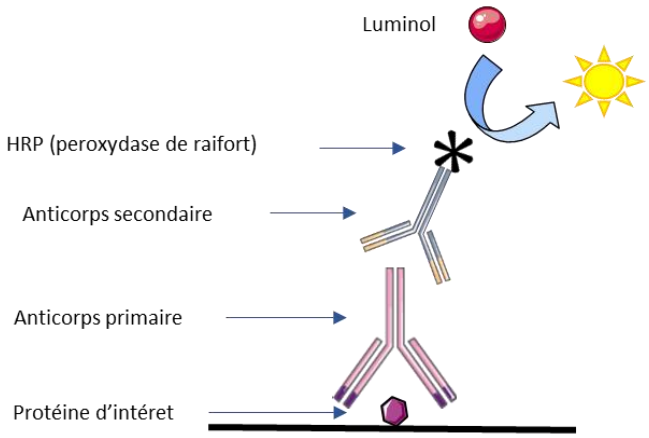


Figure 41 Schéma représentant la technique de western blot

9.2. Expression génique

9.2.1. Extraction des ARNs

Les ARNs sont extraits à partir de cellules ou de tissus. Pour l'extraction à partir de cellules, les boites sont rincées au PBS 1X puis on dépose 1ml de trizol, les boites sont grattées avec un râteau puis le liquide est récupéré dans un Eppendorf de 1.5ml. Pour les tissus, un morceau est placé dans un tube gentleMACS avec 1ml de trizol et les tissus sont broyés avec le gentleMACS dissociator. Après centrifugation des tubes, le surnageant est récupéré dans un Eppendorf de 1.5ml.

Ensuite, du chloroforme est ajouté, les tubes sont vortexés puis après centrifugation la phase aqueuse contenant les ARNs est séparée de la phase organique et est ensuite placée dans un nouvel Eppendorf. Les ARNs sont ensuite précipités avec de l'isopropanol et centrifugés pendant 15 minutes à 12000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est ensuite rincé avec de l'éthanol 75% et centrifugé. Cette opération est réalisée trois fois. Ensuite le culot est bien séché puis suspendu dans de l'eau stérile et ARNase free puis ils sont stockés à -80°C.

Les ARNs sont ensuite dosés au nanodrop et leur pureté est vérifiée par le ratio d'absorbance. Le ratio A260nm/A280nm témoigne de la contamination en protéines et doit être supérieur à 1.7. Le ratio A260nm/A270nm témoigne de la contamination en phénol et doit être supérieur à 1.2.

9.2.2. Transcriptase inverse des ARNs

Le kit QuantiTect Reverse Transcription de chez Qiagen est utilisé. Cette étape consiste à modifier les ARNs extraits en ADN complémentaire (ADNc). Premièrement une étape d'élimination de l'ADN génomique est réalisée afin de s'assurer d'avoir que des ARNs, on utilise des DNAses. Ensuite on va synthétiser l'ADNc en ajoutant la transcriptase inverse, un mélange d'amorces aléatoires et des polydT à nos échantillons (1µg d'ARN). La réaction se fait en 15 minutes à 42°C au thermocycleur. L'activité de l'enzyme est ensuite arrêtée en chauffant à 95°C pendant 3 minutes.

9.2.3. RT-qPCR

C'est la dernière étape qui va permettre de quantifier la quantité d'ADNc présent dans les échantillons. La qPCR est réalisée avec la technique Taqman. La qPCR se réalise en trois étapes qui vont se répéter pendant 40 cycles, une première étape de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes ou l'ADNc double brin va se séparer en simple brin. Une étape d'hybridation où les amorces spécifiques du gène d'intérêt ainsi que la sonde Taqman vont venir se fixer. La sonde Taqman est spécifique d'une région de notre gène d'intérêt et est composée d'un fluorophore d'une part et d'un suppresseur ou Quencher d'autre part. Le suppresseur bloque la fluorescence du fluorophore. Enfin la dernière partie consiste en l'élongation à 60°C pendant 1 minute des amorces grâce à la Taq polymérase, qui va aussi pouvoir dégrader la sonde Taqman grâce à son activité exonucléase de 5' en 3'. Cela va séparer le fluorophore du suppresseur et il va alors y avoir émission d'une fluorescence.

L'intensité du signal fluorescent sera alors proportionnelle à la quantité de copies synthétisées et donc au nombre d'ADNc de notre gène d'intérêt. La qPCR est ensuite analysée avec les Cts de chaque échantillon (threshold cycle) qui correspond au cycle à partir duquel l'intensité de fluorescence a atteint un seuil qui est fixé avant l'expérience et qui est le même pour tous les gènes analysés. Ce Ct est ensuite soustrait au Ct du gène de référence utilisé comme la β-actine ou 18S. Ces gènes de référence permettent de normaliser le résultat obtenu par la quantité réelle d'ADNc de l'échantillon. On obtient alors un ΔCt, ce ΔCt va alors être soustrait à un échantillon de référence ce qui va permettre de comparer la différence d'expression de chaque échantillon et on obtient le ΔΔCt. Enfin la quantité relative de chaque échantillon est calculée avec l'équation $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

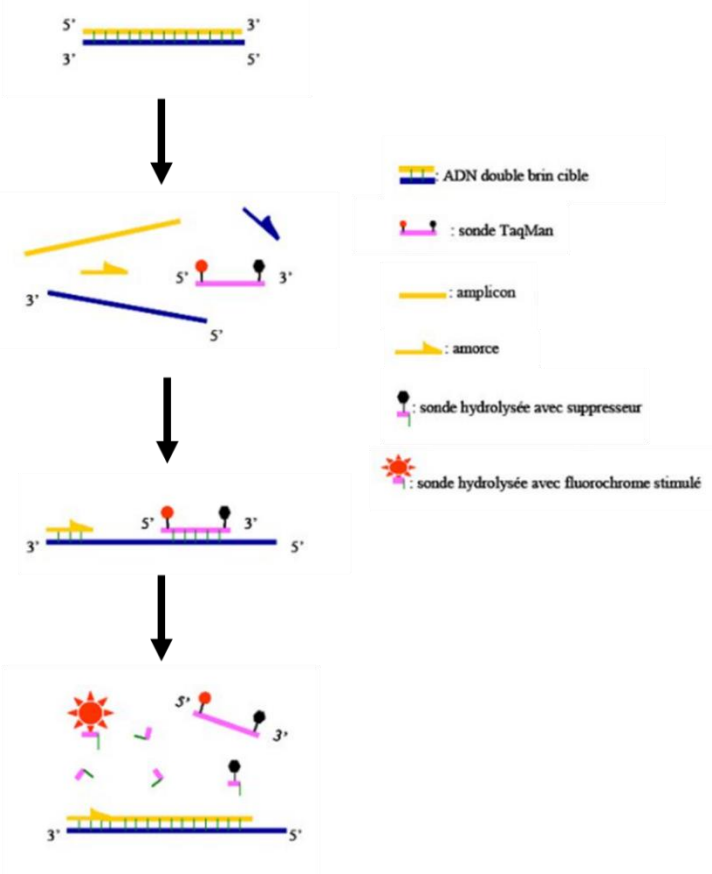


Figure 42 Schéma représentatif des étapes de la qPCR avec la technique Taqman

Exposé des travaux

PROJET 1: Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in pulmonary Vascular Cells

Auteurs : Le Ribeuz H, Dumont F, Ruellou G, Lambert M, Balliau T, Quatredeniers M, Girerd B, Cohen-Kaminsky S, Mercier O, Yen-Nicolaÿ S, Humbert M, Montani D, Capuano V, Antigny F

État : Accpeté International Journal of molecular science

doi: 10.3390/ijms21197400.

1. Rationnel

Depuis la découverte en 2013 de mutations dans le gène *KCNK3* chez des patients atteints d'HTAP, il a été mis en évidence par l'équipe que la perte d'expression et fonction du canal KCNK3 n'était pas retrouvée seulement chez les patients atteints d'HTAP muté pour KCNK3, mais également chez les patients HTAPi, HTAPh (mutations *BMPR2*) ainsi que dans différents modèles expérimentaux d'HTP. De plus, l'équipe a également confirmé, en utilisant un modèle de rats mutés pour *Kcnk3* que la perte de fonction de KCNK3/TASK1 favorise le développement de l'HTAP chez le rat, en induisant une vasonstriction des AP, une altération de la relaxation des AP dépendante de l'endothélium, une néomuscularisation des vaisseaux pulmonaires distaux. Il avait également été mis en évidence que la perte d'expression de KCNK3 par l'utilisation d'un siRNA entrainait une augmentation de la prolifération des CML-APs contrôles humaines ce qui était associé à une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2, une augmentation d'expression de HIF1α et une dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cependant, les mécanismes moléculaires liés à la perte d'expression ou de fonction de KCNK3/TASK1 et les conséquences phénotypiques n'étaient pas ou peu connus au niveau des CML-APs et CE-APs.

2. Objectif de l'étude

Le but de cette étude était d'identifier les conséquences moléculaires de la perte d'expression de KCNK3 dans les cellules vasculaires pulmonaires (CE-APs et CML-APs) en utilisant une approche de siARN et en réalisant ensuite une approche protéomique.

3. Méthodes

Les cellules utilisées sont issues de culture primaire venant de prélèvement pulmonaire de patients non HTAP dit contrôles qui sont des patients atteints de cancer du poumon et ayant subi une lobectomie. Le prélèvement est situé à distance de la zone cancéreuse. Les cellules ont été transfectées 72h avec un siContrôle ou siKCNK3 et la perte d'expression de KCNK3 a été mesurée par RT-qPCR. L'analyse de protéomique des échantillons cellulaires a ensuite été réalisée par chromatographie en phase liquide avec spectromètre de masse (LC-MS-MS). Puis une analyse bio-informatique a été réalisée sur les valeurs brutes afin d'éliminer de potentielles contaminations (trypsine, kératine...). L'analyse statistique a été réalisée avec MassChroqR ou la normalité et l'homogénéité des données ont été analysées. Les résultats ont été collectés en regroupant des familles de protéines. Un sous-groupe dans la famille présente un peptide spécifique unique. Chaque sous-groupe correspond à une protéine unique et les protéines sont caractérisées par leur numéro spectral. Deux analyses ont été réalisées par comptage du SC (spectral counting)(SC) ou par comptage des XIC (eXtracted Ion Current)et les résultats ont été additionnés.

Nous avons ensuite sélectionné une valeure seuil pour ne garder que des protéines qui sont différentiellement exprimées à 1.5 ou -1.5 entre les conditions.

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée afin d'identifier des clusters d'expression protéiques entre les échantillons. Des western blots ont été réalisés sur différentes protéines mises en évidence par le LC-MS-MS afin de confirmer les résultats. Un volcano plot et une heat map ont également été réalisés pour mettre en évidence la présence d'un protéome diffèrent entre les groupes sicontrôles et siKCNK3 dans les CML-APs et CE-APs ontroles.

Enfin, le logiciel Ingenuity pathway analysis (IPA)) nous a permis de mettre en évidence des voies canoniques et des fonctions biologiques dérégulées ainsi que des réseaux fonctionnels.

4. Résultats

Cette analyse protéomique, par la technique LC-MS-MS, des CML-APs et CE-APs traitées avec un siContrôle ou un siKCNK3 a révélé un total de 2676 protéines différentiellement exprimées dans les CE-APs entre la condition siCcontrôle et siKCNK3 et 1735 protéines dans les CML-APs entre le siCcontrôle et le siKCNK3. 1472 protéines sont communes aux deux types cellulaires. De plus, l'ACP a mis en évidence la présence de deux clusters distincts entre les CML-APs ou CE-APs traitées au siContrôle et celles traitées avec le siKCNK3. Cela révèle bien une différence de protéome en absence de KCNK3. Dans les CE-APs, nous avons mis en évidence 157 protéines dont l'expression est augmentée en absence de KCNK3 et 247 protéines dont l'expression est diminuée. Dans les CML-APs nous avons identifié 111 protéines avec une expression augmentée et 154 avec une expression diminuée.

Parmi ces dernières nous avons sélectionné les protéines, HMOX-1, EIF2AK2 (PKR) et IFIT3, afin de confirmer ces différences d'expression par Western blot.

Avec le logiciel IPA nous avons pu identifier que la perte de KCNK3 dans les CE-APs entraine la dérégulation de 30 voies canoniques et 15 fonctions biologiques, la différence d'expression de 48 facteurs de transcription. Pour les CML-APs nous avons identifié que la perte de KCNK3 avait un impact sur 14 voies canoniques et 9 fonctions biologiques et que cela altérait l'expression de 16 facteurs de transcriptions.

Pour les CE-APs IPA nous a permis de mettre en évidence que la perte de KCNK3 entrainait une réduction de fonction de la voie EIF2 (eukariotic initiation factor 2 et une activation de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) et de la voie de la dégradation de la méthionine. La voie de signalisation EIF2 intègre diverses voies activées par un stress et entraine la régulation de certains ARNm. La signalisation mTOR est un régulateur de la croissance cellulaire en intégrant différents signaux de l'environnement. De plus, certaines fonctions biologiques ont également été retrouvées inhibées dans les CE-APs siKCNK3 comme l'épissage des ARNs, la transcription des ARNs, la mort cellulaire neuronal, la survie cellulaire et le catabolisme des protéines alors que la mort cellulaire et le métabolisme des lipides membranaires sont augmentés.

Dans les CML-APs siKCNK3 nous avons identifié que la voie EIF2, la voie de biosynthèse des nucléotides de type purine et la voie de l'interleukine 8 (IL-8) sont réduites tandis que la voie du phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine kinase Akt (PI3K/Akt) est activée. La voie de

biosynthèse des nucléotides de type purine est une voie très conservée entre les espèces et participe au métabolisme cellulaire et au maintien de la structure de l'ADN et de la production d'ARN. L'IL8 est une cytokines pro inflammatoire et qui peut agir sur l'expression de différents gènes. La voie PI3K/Akt agit en tant que régulateur du cycle cellulaire et a déjà été décrite pour être surexprimée dans l'HTAP. De plus, la perte de KCNK3 dans les CML-APs est associée avec l'activation de fonctions biologiques comme la propagation cellulaire et leur changement de forme, la migration des cellules et la mort des cellules.

Enfin, nous avons trouvé 53 protéines significativement dérégulées dans les CML-APs et CE-APs siKCNK3. Les voies canoniques mises en évidence sont la voie NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) et la voie des interférons. La voie NRF2 est activée dans les cellules siKCNK3 et NRF2 est un facteur de transcription qui régule beaucoup de gènes impliqués dans la synthèse du gluthathion et du stress oxydant. La voie de signalisation des interférons est diminuée dans les CML-APs siKCNK3 et cette voie joue un rôle central dans la réponse immunitaire pour permettre de protéger les cellules contre une infection virale.

5. Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'impact de la perte d'expression de KCNK3 sur le protéome des CML-APs et CE-APs. Nous avons découvert que certaines voies déjà connues pour être altérées dans l'HTAP l'était aussi par la perte de KCNK3 comme la voie PI3K/Akt, mTOR ou l'augmentation d'expression de HMOX-1 et l'inhibition de PKR.

De plus, cette étude nous a également permis de mettre en évidence d'autres voies, moins ou non décrites dans la physiopathologie de l'HTAP comme la voie des interférons, de synthèse des purines, de EIF2 ou NRF2...

Nous avions montré dans une précédente étude que la perte de KCNK3 était associée avec l'activation de ERK1/2, la stabilisation de HIF1α et la phosphorylation plus importante de Akt, entrainant l'augmentation de prolifération des CML-APs. Dans cette étude nous avons mis en évidence que la dérégulation de KCNK3 est associée à l'activation de grandes voies impliquées dans la prolifération et survie cellulaire comme mTOR et PI3K/Akt. Ces voies sont bien connues pour promouvoir le développement tumoral, et plusieurs études ont déjà émis le lien étroit entre le développement d'un cancer de l'HTAP(Boucherat et al. 2017).

Dans les CE-APs et CML-APs transfectées avec le siKCNK3, nous avons mis en évidence la dérégulation de la grande voie de signalisation EIF2. EIF2 est un acteur de la voie de la réponse

intégrée au stress (RIS). Pour retrouver une homéostasie cellulaire cette voie va activer la voie adaptée pour répondre au stress grâce à des RIS kinases (GCN2, PERK, HRI et PKR). Cela entraine l'activation d'un facteur de transcription (ATF4) qui peut entrainer l'expression de plusieurs protéines, dont HMOX-1. HMOX-1 est bien décrite pour pouvoir promouvoir la survie cellulaire en réponse à un stress oxydatif et est augmentée dans plusieurs types de cancers(Dulak et al. 2008). HMOX-1 peut aussi participer la transition endoMT et est aussi activée par un stress du RE et peut inhiber l'apoptose. De plus, NRF2 est un facteur de transcription qui promeut la réponse liée au stress oxydant. La perte de KCNK3 dans les CML-APs et CE-APs est à l'origine d'une forte réponse des voies liées au stress oxydant.

Dans cette étude nous avons découvert que dans les CML-APs et CE-APs transfectées avec le siKCNK3, plusieurs protéines IFIT (Interferon Iduced proteins with Tetratricopeptide) étaient diminuées (notamment IFIT1, IFIT3, IFIT6, IFITX). Ces protéines sont exprimées lors d'une infection virale. De même, KCNK3 est connu pour avoir un rôle dans la réponse virale notamment du VIH. Il a été montré que la surexpression de KCNK3 entraine la réduction de la sortie de particules virales par la protéine accessoire du VIH (Vpu). À l'inverse le Vpu peut entrainer une diminution du courant KCNK3(Hsu et al. 2004). Le VIH est un facteur de risque connu pour le développement de l'HTAP et nos résultats suggèrent que la perte de fonction de KCNK3 pourrait faciliter le développement de L'HTAP chez des patients infectés au VIH ou d'autres infections virales.

Nous avons également mis en évidence une diminution de la voie de la dégradation de la méthionine dans les CE-APs siKCNK3. Cela suggère que la perte d'expression de KCNK3 entraine l'augmentation de Méthionine (Met) ce qui peut entrainer l'activation de la voie mTOR, ce qui comme décrit plus haut peut avoir un impact sur le développement de l'HTAP. Un haut taux de Met peut également hypermethylé l'ADN et produire des effets épigénétiques indésirables(Gamen, Seeger, et Pullamsetti 2016). Notamment, il a été décrit dans l'HTAP qu'il y a une altération dans la méthylation de SOD2, qui est liée à la prolifération vasculaire pulmonaire et dont nous avons trouvé que son expression est réduite dans les CE-APs et CML-APs siKCNK3.

Enfin nous avons également mis en évidence que la perte d'expression de KCNK3 dans les CE-APs et CML-APs entraine une activation de la glycolyse notamment par la réduction du glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) qui est un important producteur de NADPH. Des

études avaient mis en évidence une déficience en G6PD chez les patients atteints d'HTAP(Kurdyukov et al. 2018).

6. Conclusions

Pour conclure, cette étude a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes et fonctions cellulaires dérégulées dans les cellules vasculaires pulmonaires (CE-APs et CML-APs) par la perte d'expression de KCNK3. Ainsi, notre étude suggère que la dysfonction de KCNK3/TASK1 pourrait avoir des conséquences sur survie cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, la migration/invasion des cellules, plusieurs voies connues pour entrainer le développement de cancers, mais également une diminution de la réponse à une infection virale, une augmentation des voies en réponse à divers stress (oxydant, métabolique.). Cela a donc permis de mettre en évidence de nouvelles voies pouvant être impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP médiée par la perte d'expression de KCNK3.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells

Hélène Le Ribeuz [1,2,3], Florent Dumont [4], Guillaume Ruellou [4], Mélanie Lambert [1,2,3], Thierry Balliau [5], Marceau Quatredeniers [1,2,3], Barbara Girerd [1,2,3], Sylvia Cohen-Kaminsky [1,2,3], Olaf Mercier [1,2,3], Stéphanie Yen-Nicolaÿ [4], Marc Humbert [1,2,3], David Montani [1,2,3], Véronique Capuano [1,2,3] and Fabrice Antigny [1,2,3,*]

1 Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France; helene.leribeuz@aol.com (H.L.R.); melanie.lambert91@hotmail.fr (M.L.); quatredeniers.marceau@gmail.com (M.Q.); barbara.girerd19@gmail.com (B.G.); sylvia.cohen-kaminsky@universite.paris-saclay.fr (S.C.-K.); olaf.mercier@gmail.com (O.M.); marc.humbert@bct.aphp.fr (M.H.); davidmontani@gmail.com (D.M.); veronique.capuano@universite.paris-saclay.fr (V.C.)
2 INSERM UMR_S 999, Hypertension Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Hôpital Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France
3 Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France
4 UMS Ingénierie et Plateformes au Service de l'Innovation Thérapeutique, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France; florent.dumont@universite.paris-saclay.fr (F.D.); guillaume.ruellou@universite.paris-saclay.fr (G.R.); stephanie.nicolay@universite-paris-saclay.fr (S.Y.-N.)
5 PAPPSO-GQE-Le Moulon, INRAE, CNRS, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France; thierry.balliau@inrae.fr
* Correspondence: fabrice.antigny@universite.paris-saclay.fr; Tel.: +33-140-942-299; Fax: +33-140-942-522

Received: 11 September 2020; Accepted: 5 October 2020; Published: 7 October 2020

Abstract: The physiopathology of pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) and endothelial cell (PAEC) dysfunction, contributing to pulmonary arterial obstruction and PAH progression. KCNK3 loss of function mutations are responsible for the first channelopathy identified in PAH. Loss of KCNK3 function/expression is a hallmark of PAH. However, the molecular mechanisms involved in KCNK3 dysfunction are mostly unknown. To identify the pathological molecular mechanisms downstream of KCNK3 in human PASMCs (hPASMCs) and human PAECs (hPAECs), we used a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry-based proteomic approach to identify the molecular pathways regulated by KCNK3. KCNK3 loss of expression was induced in control hPASMCs or hPAECs by specific siRNA targeting KCNK3. We found that the loss of KCNK3 expression in hPAECs and hPASMCs leads to 326 and 222 proteins differentially expressed, respectively. Among them, 53 proteins were common to hPAECs and hPASMCs. The specific proteome remodeling in hPAECs in absence of KCNK3 was mostly related to the activation of glycolysis, the superpathway of methionine degradation, and the mTOR signaling pathways, and to a reduction in EIF2 signaling pathways. In hPASMCs, we found an activation of the PI3K/AKT signaling pathways and a reduction in EIF2 signaling and the Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II and IL-8 signaling pathways. Common to hPAECs and hPASMCs, we found that the loss of KCNK3 expression leads to the activation of the NRF2-mediated oxidative stress response and a reduction in the interferon pathway. In the hPAECs and hPASMCs, we found an increased expression of HO-1 (heme oxygenase-1) and a decreased IFIT3 (interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats 3) (confirmed by Western blotting), allowing us to identify these axes to understand the consequences of KCNK3 dysfunction. Our experiments, based on the loss of KCNK3 expression by a specific siRNA strategy in control hPAECs and hPASMCs, allow us to identify

differences in the activation of several signaling pathways, indicating the key role played by KCNK3 dysfunction in the development of PAH. Altogether, these results allow us to better understand the consequences of KCNK3 dysfunction and suggest that KCNK3 loss of expression acts in favor of the proliferation and migration of hPASMCs and promotes the metabolic shift and apoptosis resistance of hPAECs.

Keywords: PAH; potassium channel; proteomic

1. Introduction

Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) was identified in 2013 as a predisposing gene for pulmonary arterial hypertension (PAH) [1]. To date, 12 different mutations in *KCNK3* have been described in PAH patients [2]. PAH is a severe and progressive disease, with an estimated prevalence of 15 to 50 per million of the population [3]. Under the new clinical classification [4], PAH consists of different etiologies leading to precapillary pulmonary hypertension, which is hemodynamically proposed to be defined by a mean pulmonary artery pressure (mPAP) >20 mmHg, a pulmonary artery wedge pressure <15 mmHg, and a pulmonary vascular resistance (PVR) >3 Wood units at rest [4]. *KCNK3* mutations carrier patients have a higher mPAP and are younger than idiopathic PAH (iPAH) patients at diagnosis [2]. All the identified *KCNK3* mutations result in a loss of function in KCNK3 channels [1,2]. KCNK3, also known as Twik-related-acid-sensitive-K^+ channel (TASK-1) or K2P3.1, displays several electrophysiological characteristics of background K^+ current, including minimal voltage sensitivity, extracellular pH sensitivity, resistance to classical K^+ channel inhibitors, and insensitivity to cytoplasmic Ca^{2+} [5]. TASK-1 channels are expressed in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and endothelial cells (PAECs) [6].

In the absence of *KCNK3* mutations, we found a reduced TASK-1 function or expression in lung or isolated pulmonary arteries (PA) from heritable PAH (*BMPR2* carriers patients) and iPAH patients, as well as in isolated PASMCs, demonstrating that reduced KCNK3 function/expression is a hallmark of PAH at the pulmonary vascular level [7]. Otherwise, we recently found that *Kcnk3* deficiency in rats (CRISPR/Cas9 technology) leads to higher susceptibility to monocrotaline- or chronic hypoxia-induced PH, confirming that KCNK3 loss of function predisposes one to the development of PAH. We also found that *KCNK3* knockdown enhances proliferation in control human PASMCs (hPASMCs) [8].

In PAH, the PA obstruction is multifactorial, involving at least hPAECs and hPASMCs dysfunctions, leading to excessive PA vasoconstriction, an over-proliferation of PASMCs and PAECs associated with apoptosis resistance, and pro-inflammatory phenotypes. Most of these phenotypes were persistent in vitro in cultured hPASMCs and hPAECs from PAH patients [9].

In pulmonary vascular cells, K^+ channels play major role in the control of cell contraction, cell proliferation and survival, cell volume, and cell apoptosis [2]. However, the role of KCNK3 dysfunction in the proliferation/apoptosis imbalance of hPASMCs and hPAECs is still unclear, as well as the molecular mechanism link to KCNK3 dysfunction and the aberrant phenotype of hPASMCs or hPAECs in PAH.

To identify the pathological molecular mechanisms induced by KCNK3 loss of expression in hPASMCs and hPAECs, we postulated that a differential proteomic analysis between siControl and siKCNK3 conditions would identify the crucial signaling pathways to better understand the contribution of KCNK3 dysfunction to PAH pathobiology. We used a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)-based proteomic approach coupled with bioinformatics analysis to understand the consequences of KCNK3 dysfunction in hPASMCs and hPAECs.

2. Material and Methods

2.1. Human PASMCs and PAECs Cell Culture

Human lung specimens were obtained at the time of a lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from control subjects. Pulmonary arteries were excised at a distance from tumor areas. hPAECs and hPASMCs were cultured as previously described [10,11], and were used for the study at passage 4. The patients studied were part of a program approved by the institutional Ethics Committee, and had given their written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006). Five patients for the condition of hPAECs and 5 patients for hPASMCs were compared in this experiment, and each of these cohorts was duplicated into siControl vs. siKCNK3 conditions, giving a total of 20 samples. The results and statistics were taken from an average of 5 patients per condition.

2.2. Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to standard procedures. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 205311). Gene expression was quantified using qPCR following the standard protocol for ready-to-use TaqMan gene expression assays (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The predesigned probe sets used for experiments were human KCNK3 (Hs00605529_m1 Thermo Scientific, Paris, France) and human 18S (Hs99999901_s1 Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

2.3. Western Blot Analyses

Total proteins from hPASMCs and hPAECs or rat lung-tissue samples were prepared as described previously [12]. Anti-HO-1 (Abcam; ab13248) was used at 1/1000, anti-IFIT3 (Clinisciences, Nanterre, France; sc-393396) was used at 1/1000, and anti-β-Actin was used for normalization.

2.4. Protein Preparation

A total of 20 µg of proteins from each sample was loaded per land on a 12% SDS-PAGE. A short migration was then performed, allowing the proteins to penetrate the gel, and the gels were stained with Coomassie colloidal blue (EZblue, Sigma–Aldrich, Lyon, France) in order to recover a 2 mm band containing all the proteins.

2.5. Protein In-Gel Digestion

A reduction/alkylation step was performed with dithiothreitol (DTT) at 10 mM and iodoacetamide at 55 mM. Pieces of the gels were rehydrated at 4 °C in 12 ng/µL of sequencing-grade modified trypsin (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France) solubilized in 25 mM of NH_4HCO_3 for 1 h and then digested at 37 °C overnight. After tryptic digestion, the peptides were extracted by incubating gel pieces in extraction solvent (0.1% AF/50% ACN).

2.6. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analysis

As described in a previous study [13], samples were analyzed on a nano-LC Ultra 2D (eksigent) on-line with a high-resolution mass spectrometer Q-Exactive (Thermo Scientific, France) using a nanoelectrospray interface in positive polarity mode. For each sample, 4 µL of protein digest was loaded onto a Biosphere C18 Precolumn (0.1 × 20 mm, 100 Å, 5 µm; Nanoseparation) at 7.5 µL/min and desalted with 0.1% (*v/v*) formic acid and 2% (*v/v*) Acetonitrile. After 3 min, the precolumn was connected to a Biosphere C18 Nanocolumn (0.075 × 300 mm, 100 Å, 3 µm; Nanoseparation).

Electrospray ionization was performed at 1.6 kV with an uncoated capillary probe. The buffers were 0.1% formic acid in water (A) and 100% ACN (B). Peptides were separated using a linear gradient

from 5% to 30% buffer B for 75 min at 300 nL/min. One run took 95 min, including the regeneration step at 95% buffer B and the equilibration step at 95% buffer A.

Peptide ions were analyzed using the Xcalibur 4.01 Tune 2.7 (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) with the following data-dependent acquisition steps: (1) MS scan (mass-to-charge ratio (m/z) of 350 to 1400, 70,000 resolution, profile mode), (2) MS/MS (17,500 resolution, normalized collision energy of 27, profile mode). Step 2 was repeated for the eight major ions detected in step (1). Dynamic exclusion was set to 50 s.

2.7. Data Processing and Statistical Analysis

Peak lists were generated as mzXML files using rgw MSConvert software (ProteoWizard 3.0). Mass spectrometric data were searched using X!TandemPipeline software version 0.2.38 developed by the PAPPSO facility [14]. Peptide searches were performed with the following parameters: enzymatic cleavage by trypsin digestion with one possible miscleavage, precursor mass tolerance of ±10 ppm, fragment mass tolerance of 0.5 Da, static modifications of carbamidomethylated cysteine, and potential modification of oxidized methionine.

The Uniprot KB/SwissProt *uniprot_human_organism_9606* database (2019) and a homemade contaminant database (trypsin, keratine, etc.) were used. The identified proteins were filtered with a minimum of two different peptides with a peptide E-value < 0.05 and a protein E-value (product of unique peptide E values) < 10^{-5}. Combine analysis mode with all the samples was performed, and the results were collected from the grouping proteins. Within each group, proteins with at least one specific peptide relative to other members of the group were reported as subgroups. One subgroup represents one specific protein. Proteins are characterized with their spectral number. The false discovery rates (FDR) obtained for the peptide and protein identifications with a decoy databank were 0.05% and 0%, respectively.

The label-free comparative quantification of proteins was achieved through spectral counting (SC) and eXtracted Ion Current (XIC) analysis following alignment by Mass ChroQ version 2.2.12 [15].

2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the MassChroqR package developed by the PAPPSO team (R Studio version 1.0.153). After checking the normality and homogeneity of the SC data, proteins showing less than 5 spectra in any of the injections or showing a variation between the minimal and the maximal mean abundance below 1.5 in their number of spectra were removed. For XIC analysis, the peptide intensities measured as peak areas were automatically log10-transformed. Analysis included the following steps: checking the homogeneity of all runs in terms of the chromatography and signal (discarding peptides-mz with an RT > 20 s and chromatographic pics > 200 s) and normalizing the data based on the median. The RT method, keeping only peptides showing a reasonable distribution, eliminating shared peptides, eliminating peptides with more than 10% missing values and imputing missing values for peptides and proteins. By using or not using a filter on the correlation levels of the individual peptides with the mean of their protein (parameters: rCutoff = 0.5, pvalCutoff = 1), two separated lists of proteins have been produced and combined at the end of the XIC analysis. The combination of the XIC and SC analyses allowed retrieving a total of 415 proteins, showing a significant abundance variation ($p > 0.05$) between both conditions.

For Western blot and RT-qPCR analyses, the data were verified for normal distribution using the Shapiro–Wilk test for normality. These values are reported as the mean ± SEM. The difference between the two groups was assessed by a two-tailed unpaired Student's test. Differences were considered statistically significant at p-values < 0.05.

3. Results

3.1. Validation of KCNK3 Knockdown in hPASMCs and hPAECs

To decipher the changes in the proteome in response to the knockdown of *KCNK3*, an LC-MS/MS-based proteomics approach was carried in hPASMCs and hPAECs. First, to evaluate the molecular consequences of the KCNK3 loss of expression in hPASMCs and hPAECs, we reduced the KCNK3 expression using siRNA against *KCNK3*. As presented in Figure 1A, 72 h after cell transfection, the *KCNK3* mRNA was decreased by 85% in hPASMCs and by 75% in hPAECs (Figure 1A). Then, we used proteomic approach to identify and measure the relative abundance of proteins differentially expressed in hPASMCs or hPAECs transfected with siControl or with siKCNK3 (Figure 1B).

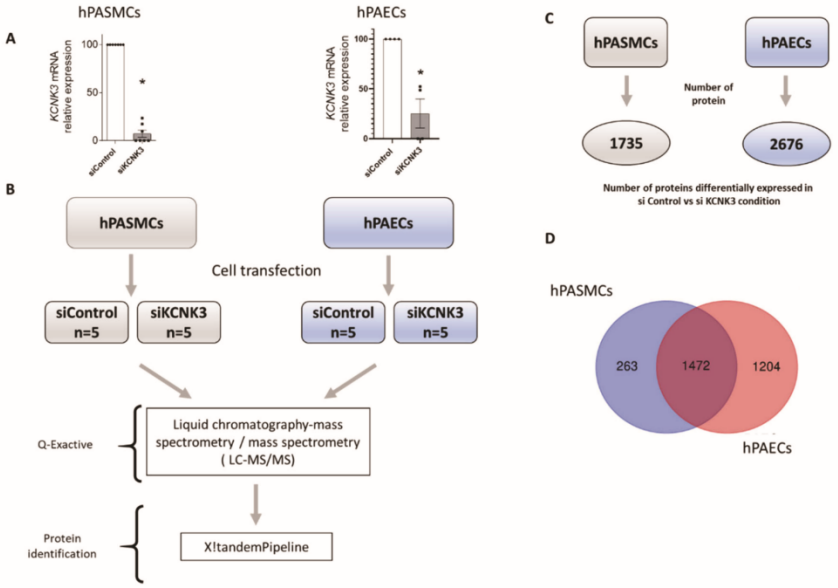


Figure 1. Experimental procedure for the proteomic approach. (**A**) siRNA validation by RT-qPCR in hPASMCs (n = 5) and hPAECs (n = 5). * $p < 0.05$ vs. control (**B**) Experimental process for the LC-MS/MS approach. (**C**) Number of proteins differentially expressed in siControl vs. siKCNK3 in hPASMCs and hPAECs. (**D**) Venn diagram representing the number of proteins identified in hPASMCs only, hPAECs only, and both hPASMCs and hPAECs.

Consistent with the purity of our hPAEC cultures, endothelial specific protein markers were found to be expressed, including Von Willebrand factor, vascular endothelial growth factor receptor 2, platelet endothelial cell adhesion molecule 1, endothelin-converting enzyme 1, angiopoietin-2, and endothelial nitric oxide synthase (not shown).

The purity of hPASMC cultures was confirmed by the absence of specific PAEC markers and the presence of specific smooth muscle markers, including alpha-actinin-1, alpha-actinin-4, myoferlin, actin, alpha cardiac muscle 1, gelsolin, transgelin-2, transgelin, caldesmon, cofilin 2 (muscle) (not shown).

3.2. Comparison of Differentially Expressed Proteins Between hPAECs and hPASMCs Treated With siControl or siKCNK3

We identified a total of 2676 proteins differentially expressed in hPAECs transfected with siControl vs. siKCNK3 (Supplementary Table S1), and a total of 1735 proteins differentially expressed in hPASMCs transfected with siControl vs. siKCNK3 (Supplementary Table S2) (Figure 1C). As shown in Figure 1D, 1472 proteins were common in both hPAECs and hPASMCs, 1204 proteins were specific

to hPAECs, and 263 were specific to hPASMCs (Figure 1D). Principal component analysis (PCA) based on the relative protein expression levels showed the differences between each patient in terms of hPASMCs and hPAECs (Figure 2A,B and Figure 2C,D, respectively), highlighting the proteome diversity in each patient, represented in axis 1. PCA also revealed the presence of two protein clusters in the hPASMCs and hPAECs experiments by separating the siControl and siKCNK3 samples under axis 4 and 5. These results demonstrated that *KCNK3* knockdown induces proteome modification in hPASMCs and hPAECs.

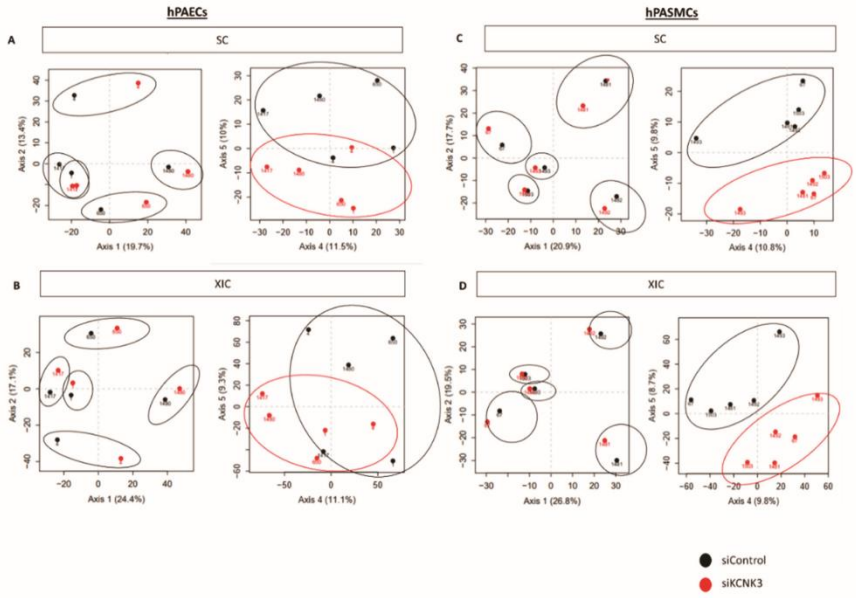


Figure 2. Principal component analysis (PCA) performed on the relative protein expression level. (**A**) PCA showing the consequence of KCNK3 knockdown on the hPAEC proteome obtained by spectral counting (SC) (siControl (black) or siKCNK3 (red)). (**B**) PCA showing the consequence of KCNK3 knockdown on the hPAECs proteome obtained by eXtracted Ion Current (XIC) analysis (siControl (black) or siKCNK3 (red)). (**C**) PCA showing the consequence of KCNK3 knockdown on the hPASMC proteome obtained by SC analysis (siControl (black) or siKCNK3 (red)). (**D**) PCA showing the consequence of KCNK3 knockdown on the hPASMCs proteome obtained by XIC analysis and SC analysis (siControl (black) or siKCNK3 (red)). All are represented with axes 1–2 and axes 4–5.

The distribution of all the differentially expressed proteins in the *KCNK3*-knockdown hPAECs (Figure 3A) and hPASMCs (Figure 3D) were illustrated in a volcano plot. The 10 proteins with the highest fold change in KCNK3-silenced hPAECs were interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3), interferon-induced protein with tetricopeptide repeats 1(IFIT1), phosphoglycolate phosphate (PGP), actine-like protein 6A (ACL6A), gap junction protein alpha-1 (CXA1), SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1 (SAMH1), transmembrane emp24 protein transport domain containing 4 (TMED4), MX dynamin-like GTPase 1 (MX1), 2′-5′-oligoadenylate synthase 2(OAS2), and 2′-5′-oligoadenylate synthase 3(OAS3) (Supplementary Table S1). In *KCNK3*-silenced hPASMCs, the 10 proteins with the highest fold change were G-protein subunit beta 4 (GBB4), DExD-Box helicase 39B (DX39B), proteasome 20S subunit beta 8 (PSB8), SEC24 Homolog A COPII coat complex component (SC24A), heme oxygenase 1 (HMOX1), LDL receptor-related protein 1 (LRP1), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (ROAA), prosaposin (SAP), cyclase-associated actin cytoskeleton regulatory protein 2 (CAP2), microtubule-associated protein 1B (MAP1B) (Supplementary Table S2).

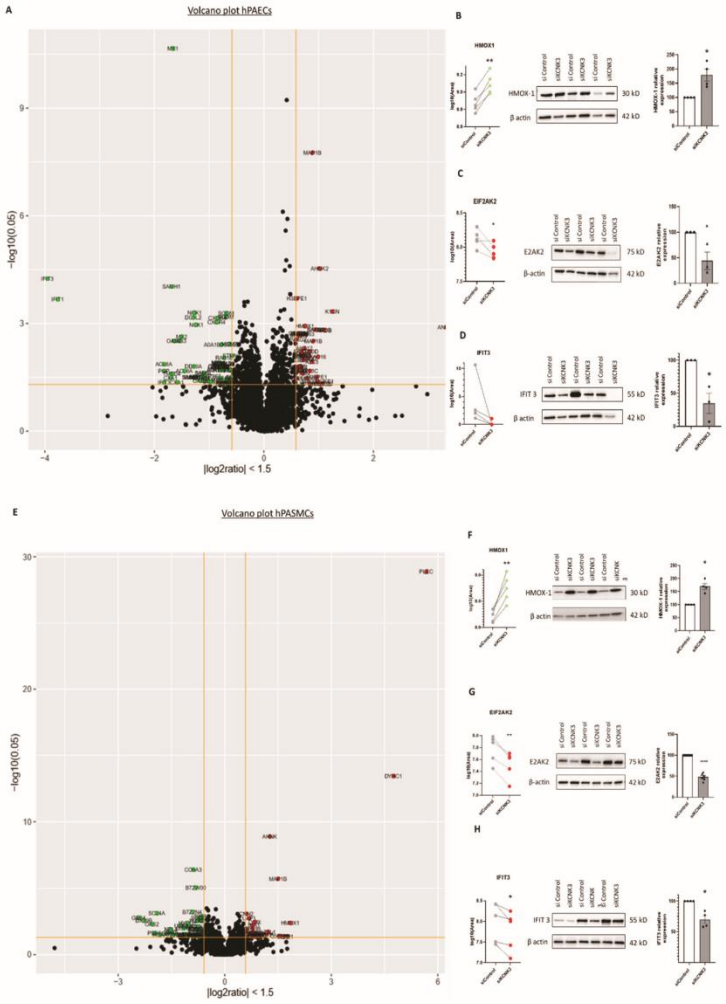


Figure 3. Volcano plot of dysregulated proteins in *KCNK3*-knockdown hPAECs and hPASMCs, and confirmation by Western blot. (**A**) Volcano plot representation of dysregulated proteins in hPAECs transfected with siKCNK3 according to their fold change (outside the yellow line interval fold change > 1.5 or < −1.5) and *p*-value (above the yellow line *p*-value < 0.05). (**B**) Comparison of the Heme Oxygenase-1 (HMOX-1 or HO-1) abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPAECs lysates. (**C**) Comparison of the EIF2AK2 abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPAECs lysates. (**D**) Comparison of Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3) abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPAECs lysates. (**E**) Volcano plot representation of dysregulated proteins in siKCNK3 hPASMCs according to their fold change (outside the yellow line interval fold change > 1.5 or < −1.5) and *p*-value (above the yellow line *p*-value < 0.05). (**F**) Comparison of the HMOX-1 (HO-1) abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPASMCs lysates. (**G**) Comparison of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 2 (EIF2AK2 or PKR) abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPASMCs. (**H**) Comparison of the IFIT3 abundance by LC-MS/MS and Western blot analysis from the same hPASMCs lysates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. control. Experiments were analyzed using the Mann–Whitney test.

Among these proteins, we selected HMOX1 (or HO-1) and IFIT3 for confirmation by the semi-quantitative Western blot approach to confirm these findings due to the importance of HMOX1 and EIF2AK2 (or PKR) in the pulmonary field [12] and due to the novelty of IFIT3 in the pulmonary hypertension field.

Among these proteins, the HMOX1/HO-1 abundances' behaviors were investigated by Western blot. Consistent with the proteomic analysis (Figure 3B,C and Figure 3E,F), the Western blot analyses showed that the HMOX-1 protein expression was significantly increased in the hPAECs (Figure 3B) and hPASMCs (Figure 3F) transfected with siKCNK3 compared to the siControl conditions, in the same way as the proteomic analysis (Figure 3A,B,E,F, Supplementary Tables S2 and S4). We also analyzed the EIF2AK2 protein expression by Western blot in hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, and we found a significant decrease in the EIF2AK2 expression in *KCNK3*-knockdown hPAECs (Figure 3C) and hPASMCs (Figure 3G) similar to the proteomic results (Figure 3A,C,E,G). Moreover, we analyzed by Western blot the IFIT3 protein expression, and we found a significant decrease in the IFIT3 expression in *KCNK3*-knockdown hPAECs (Figure 3D) and in hPASMCs (Figure 3H), similar to the proteomic results (Figure 3A,D,E,H). Altogether, these results confirmed our results from the proteomic experiments.

3.3. Global Consequences of KCNK3 Knockdown in hPAECs and hPASMCS

As highlighted by the heatmap clustering of differentially expressed proteins of each group of conditions (Figure 4A–D, we found that 157 proteins were significantly upregulated in siKCNK3, while 247 proteins were significantly downregulated in siKCNK3-transfected hPAECs (Figure 4A–D and Supplementary Table S3). A total of 111 proteins were significantly upregulated in siKCNK3, while 154 proteins were significantly downregulated in siKCNK3-transfected hPASMCs (Figure 4C,D and Supplementary Table S3). To identify the canonical pathways, predicted upstream regulators, biological functions, and disease, the significant proteins differentially expressed were analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). The IPA analysis revealed differences in 30 canonical pathways (z-score > 1 or −1), 48 upstream regulators, 15 biological functions, and 20 disease and functional networks between KCNK3-knockdown hPAECs. In the hPASMCs, the IPA analysis found significant differences in 14 canonical pathways (z score > 1 or −1), 16 upstream regulators, 9 biological functions, and 13 disease and functional networks. The activation Z-score makes predictions about potential regulators by using information about the direction of gene regulation [16].

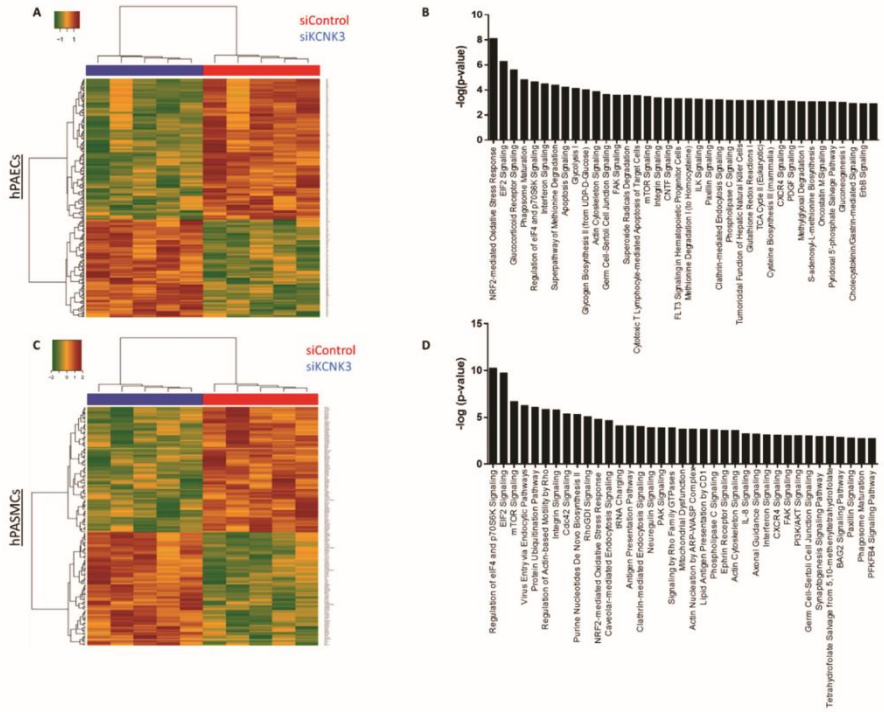


Figure 4. Heatmap of the proteomic results and pathways deregulated in siKCNK3 hPASMCs and hPAECs. (**A**) Heatmap representation for proteomic results in hPAECs. hPAECs from the same patient between the siControl and siKCNK3 conditions are clustering together. (**B**) Representation of the 37 major pathways dysregulated in siKCNK3 hPAECs found with IPA (Ingenuity Pathway Analysis) software. (**C**) Heatmap representation of proteomic results in hPASMCs. hPASMCs from the same patient between the siControl and siKCNK3 conditions are clustering together. (**D**) Representation of the 37 major pathways dysregulated in hPASMCs transfected with siKCNK3 found with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software.

3.4. Biological Consequences of KCNK3 Knockdown in hPAECs

To identify the most interesting signaling pathways, networks, diseases, and biological functions deregulated by the loss of KCNK3 expression, we separated the hPAECs specific proteome (316 proteins), the hPASMCs specific proteome (222 proteins), and the common proteome of both hPAECs and hPASMCs (53 proteins) (Supplementary Table S3).

For the hPAECs-specific proteome, we selected the five most affected canonical pathways by the combination of the highest −log(*p*-value) in association with the highest z-score. We used the IPA regulation z-score algorithm to identify the canonical pathways, upstream (positive z-score) or downstream (negative z-score) regulators, and biological functions according to our proteomic data. (positive z-score) according to our RNAseq data. In order to enhance the stringency of our analysis, we considered only functions with a z-score < -1.5 or > 1.5. Among them, our results indicate that Eukaryotic Initiation Factor 2 (EIF2) signaling (z score −1.89) was reduced in the *KCNK3*-knockdown hPAECs, and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling (z-score 2.23) and superpathway of methionine degradation (z-score 2.82) were activated in the *KCNK3*-knockdown hPAECs (Supplementary Table S4a). EIF2 signaling integrates diverse stress-related pathways to regulate both the global and specific mRNA translation. mTOR signaling is known to be a master of growth regulator that senses and integrates diverse nutritional and environmental alterations, while

the superpathway of methionine degradation, as indicated by the name, describes the degradation of the amino acid L-methionine in mammals.

In association with deregulated pathways, IPA identified abnormal biological functions such as the splicing of RNA, the processing of mRNA, neuronal cell death, cell survival, the proliferation of EC lines, neoplasia, and the catabolism of protein was found to be inhibited in *KCNK3*-knockdown hPAECs (Figure 5A,B and Supplementary Table S4b), while cell death, the metabolism of membrane lipid derivative, and the cell proliferation of breast cell line were found to be activated in *KCNK3* knockdown-hPAECs (Figure 5A,B and Supplementary Table S4b).

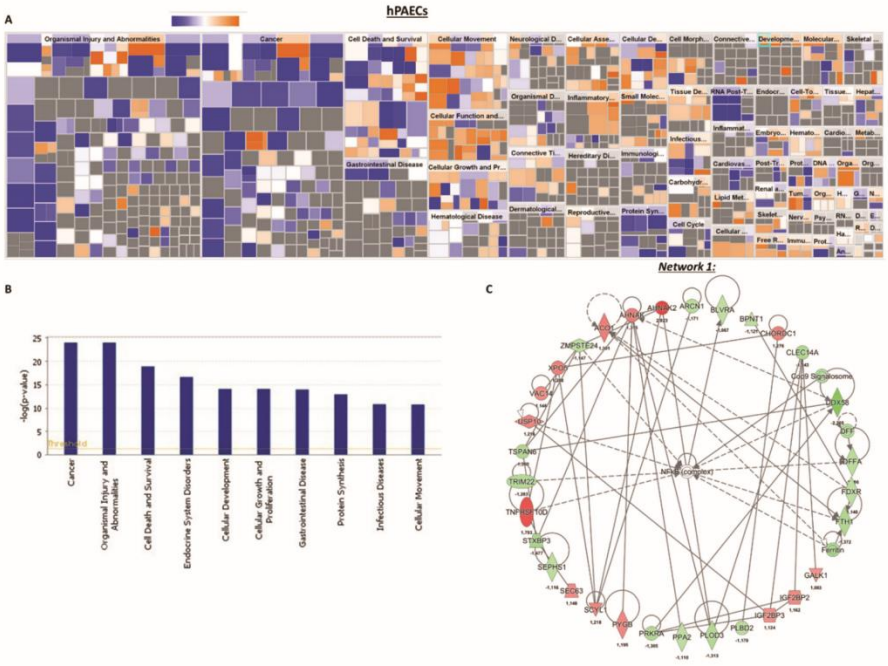


Figure 5. Deregulated biological functions in *KCNK3*-knockdown hPAECs and the protein network of interactions. (**A**) Heatmap representing the up-regulated (orange) or down-regulated (blue) biological functions in hPAECs transfected with siKCNK3. (**B**) Histogram representing the 10 first deregulated biological functions in hPAECs transfected with siKCNK3, classified according to –log (*p*-value) (**B**). (**C**) Representation of the dysregulated network 1: protein synthesis, molecular transport, hereditary disorder. Red proteins are up-regulated proteins and green proteins are down-regulated proteins.

Moreover, the IPA identified in *KCNK3*-knockdown hPAECs six upstream molecules that should be activated, including lysine demethylase 5 (KDM5), histone desacetylase 2 (HDAC2), transcription factor AP-2 alpha (TFAP2A), and NK2 Homebox 3 (NKX2-3). IPA also identified seven upstream molecules should be inhibited, including interferon alpha, interferon alpha 2 (IFNA2), serine/threonine kinase 11 (STK11), and interferon gamma (IFNG) (Supplementary Table S4c).

The differentially expressed proteins in *KCNK3*-knockdown hPAECs were associated with 19 functional networks, including protein synthesis, molecular transport (network 1) and RNA post-transcriptional modification, and cancer (network 2) (Figure 5C and Supplementary Table S4d). In this network, we found, for example, that ferritin, ferredoxin reductase (FDXR), and ferritin heavy chain 1 (FTH1) were downregulated, while TNF Receptor Superfamily Member 10d (TNFRSF10D) was upregulated (Figure 5C). These results indicate that the cellular iron storage was reduced in the absence of KCNK3, as well as TNFRS10D signaling, which is related to p53 and ERK signaling.

3.5. Biological Consequences of KCNK3 Knockdown in hPASMCs

In hPASMCs, our results indicated that four canonical pathways were reduced in *KCNK3*-knockdown hPASMCs: EIF2 signaling (z-score = °2), Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II (z-Score= −2), and Interleukine-8 (IL-8) signaling (z-score = −2.23), while one canonical pathway was activated: phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine kinase Akt (PI3K/AKT) signaling (z-score = 2.45) (Supplementary Table S5a). These results suggest an activation of the PI3K/AKT pathway and an inhibition of EIF2, Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II, and IL-8 pathways in *KCNK3*-knockdown hPASMCs. Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II is highly conserved among organisms, participating in many aspects of cellular metabolism, including the structure of DNA and RNA, serving as an enzyme cofactor, functioning in cellular signaling, acting as a phosphate group donor, and generating cellular energy. IL-8 is a pro-inflammatory CXC chemokine which is described to regulate gene expression via numerous transcription factors, modulate the cellular proteome by acting at the translational level, and modulate the cytoskeleton cell organization by acting at the posttranslational level. The PI3K/AKT pathway acts as an important regulator of the cell cycle that is directly related to cellular quiescence, proliferation, and cancer, and is described to be over-activated in PAH.

Underlying these alterations, the IPA predicted that four upstream molecules should be activated among them: ten-eleven-translocation 2 (TET2), lysine demethylase 5A (KDM5A), and homeobox A10 (HOXA10). The IPA predicted that seven upstream molecules should be inhibited in *KCNK3*-knockdown hPASMCs, among them MLX Interacting Protein Like (MLXIPL) and Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1 (HSP90B1) (Supplementary Table S5b). In association with these deregulated pathways, the IPA identified abnormal biological functions, such as the cell spreading and shape change of tumor cell lines, and cell movement, cell attachment, and cell death were found to be significantly activated in *KCNK3*-knockdown hPASMCs (Figure 6A,B and Supplementary Table S5c).

The differentially expressed proteins in *KCNK3*-knockdown hPASMCs were associated with 12 functional networks, including RNA post-transcriptional modification, cancer, hematological disease (network 1), RNA damage and repair, protein synthesis, gene expression (network 2) (Figure 6C and Supplementary Table S5d). In this network, we found, for example, that Guanine Nucleotide-Binding protein subunit beta-4 (GNB4) was downregulated, while Centrosomal Protein 170 (CEP170) and (AHNAK) were upregulated (Figure 5C). The reduced expression of GNB4 could have as a consequence a reduced GTPase activity in *KCNK3*-knockdown hPASMCs, while the over-expression of CEP170 and AHNAk should contribute to the enhancement of microtubule organization, cell structure and migration, and calcium channel regulation in *KCNK3*-knockdown hPASMCS.

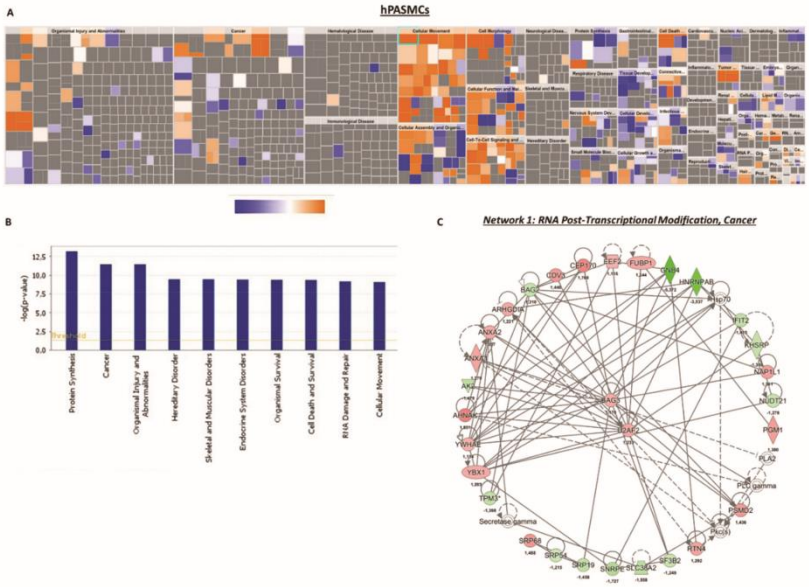


Figure 6. Deregulated biological functions in *KCNK3*-knockdown hPASMCs and the protein network of interactions. (**A**) Heatmap representing the up-regulated (orange) or down-regulated (blue) biological functions in hPASMCs transfected with siKCNK3. (**B**) Histogram representing the 10 first deregulated biological functions in hPASMCs transfected with siKCNK3, classified according to –log (*p*-value). (**C**) Representation of the dysregulated network 1: RNA post-transcriptional modifications, cancer, and hematological disease. Red proteins are up-regulated proteins and green proteins are down-regulated proteins.

3.6. Common Deregulated Pathways to KCNK3-Knockdown hPAECs and hPASMCs

We found that 53 proteins were common to hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3 (Supplementary Table S6a). Using IPA, we identified two canonical pathways with a z-score value, NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) and interferon signaling, with s z-score prediction of 1.34 and −2, respectively, in hPASMCs, and with a z-score predicted value of 0.44 and −2, respectively, in hPAECs (Figures 7A and 8A). These results suggest an activation of NRF2 pathway and an inhibition of interferon signaling in *KCNK3*-knockdown hPAECs and hPASMCs. NRF2 is a transcription factor that regulates several genes (>600) involved in glutathione synthesis, antioxidant proteins, enzyme activity, transporter activity, metabolism, and transcription. The interferon signaling plays a critical role in the immune response, conferring a cellular resistance to viral infection.

Based on our enrichment data, the IPA identified that 10 molecules could explain the decrease in interferon signaling. These inhibited upstream molecules were interferon lambda 1 (IFNL1), interferon regulatory factor 1 (IRF1), interferon beta (IFN Beta), interferon alpha 2 (IFNA2), interferon alpha/beta receptor (IFNAR), interferon regulatory factor 7 (IRF7), interferon gamma IFNG, interferon regulatory factor 3 (IRF3), interferon beta 1(IFNB1), and interferon alpha (Supplementary Table S6b). Moreover, the IPA predicted that only four molecules were activated: bruton tyrosine kinase (BTK), atypical chemokine receptor 1 (ACKR2), mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), and ETS variant transcription facto 6-RUNX family transcription factor 1 (ETV6-RUNX1) (Supplementary Table S6b). IPA identified that these dysregulated pathways were related to abnormal biological functions, such as the cell death of myeloid cells, and cell cycle progression was found to be significantly inhibited, while DNA damage was found to be significantly activated in both hPAECs and hPASMCs lacking KCNK3 (Figures 7B and 8B and Supplementary Table S6c).

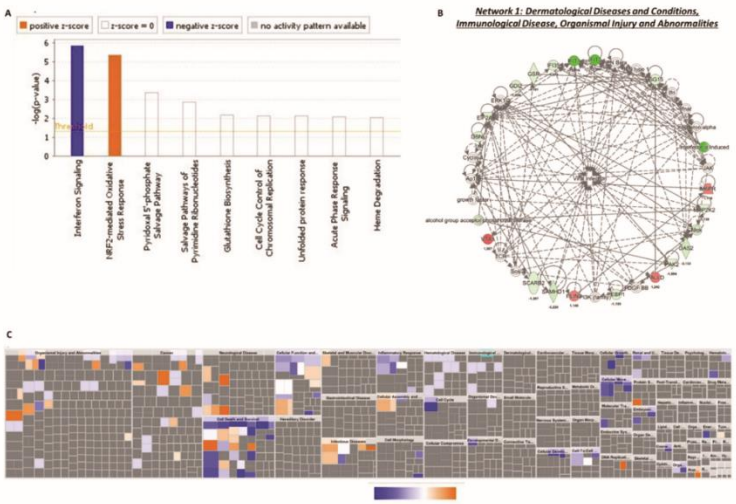


Figure 7. Common deregulated functions in hPASMCs and hPAECs transfected with siKCNK3. (**A**) Histogram representing the 2 deregulated canonical pathways in hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, using the fold change obtained in hPAECs transfected cells. (**B**) Heatmap representing the up-regulated (orange) or down-regulated (blue) biological functions in hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, using the fold change obtained in hPAECs transfected cells. (**C**) Representation of dysregulated network 1: immunological disease and organismal injury and abnormalities. Red proteins are up-regulated proteins and green proteins are down-regulated proteins.

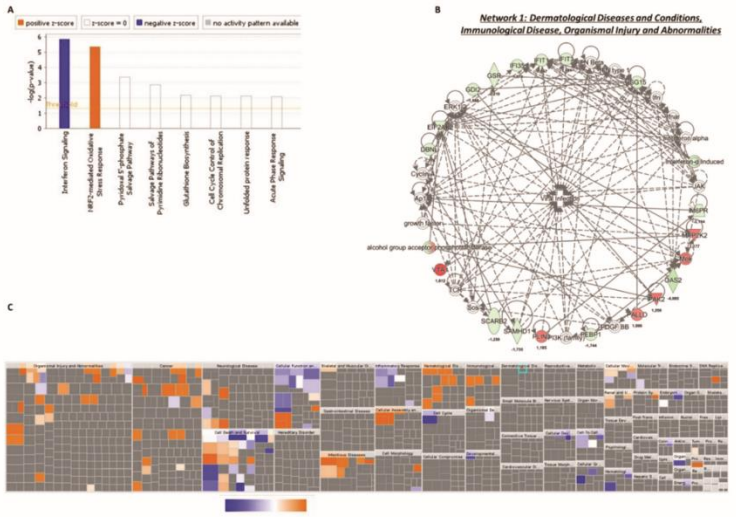


Figure 8. Common deregulated functions in hPASMCs and hPAECs transfected with siKCNK3. (**A**) Histogram representing the 2 deregulated canonical pathways in the hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, using the fold change obtained in hPASMCs transfected cells. (**B**) Heatmap representing the up-regulated (orange) or down-regulated (blue) biological functions in hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, using the fold change obtained in hPASMs transfected cells. (**C**) Representation of dysregulated network 1: immunological disease and organismal injury and abnormalities. Red proteins are up-regulated proteins and green proteins are down-regulated proteins.

Finally, the common differentially expressed proteins in *KCNK3*-knockdown hPAECs and hPASMCs were associated with four functional networks, including the networks immunological disease, organismal injury, and abnormalities (network 1) (Figures 7C and 8C, and Supplementary Table S6d). In this network and in accordance with the previous upstream identified molecules, we found, for example, that interferon induced protein 35 (IFI35), IFIT1, IFIT3, and interferon-α induced proteins were downregulated in hPAECs and hPASMCs transfected with siKCNK3, as well as Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 2 (EIF2AK2) (Figures 7C and 8C). Common to hPAECs and hPAECs, vesicle trafficking 1 (VTA1) was overexpressed in siKCNK3 conditions (Figures 7C and 8C). The reduced expression of interferon-signaling proteins suggest that, in the absence of KCNK3, hPASMCs and hPAECs should have a drop in their viral infection response. Whereas, the overexpression of VTA1 should contribute to the intensification of lysosomal protein degradation in *KCNK3*-knockdown hPAECs and hPASMCS. These common deregulated pathways in hPAECs and hPASMCs have highlighted the fact that KCNK3 has an unexpected similar function in hPAECs and hPASMCs, despite the different physiological cell functions, suggesting that these commonly identified pathways are directly related to KCNK3 and independent of cell systems.

4. Discussion

KCNK3 reduced function and expression is a hallmark of PAH. KCNK3 dysfunction is described to lead to the plasma membrane depolarization of PASMCs, pulmonary artery vasoconstriction, and increased PASMC proliferation. However, the molecular mechanisms linked to KCNK3 dysfunction in hPASMCs and hPAECs are mostly unknown.

In the present study, beyond the deregulated pattern expected in *KCNK3* knockdown in hPASMCs and hPAECs, the proteomic approach has highlighted new relevant deregulated pathways. Indeed, the KCNK3 loss of expression induces the inhibition of interferon signaling, EIF2 signaling (in hPAECs and hPASMCs), and purine nucleotides de novo biosynthesis II and IL-8 signaling (in hPASMCs). In addition, KCNK3 loss of expression induces the activation of the NRF2 pathway (in hPAECs and hPASMCs), glycolysis, apoptosis signaling, the superpathway of methionine degradation and mTOR signaling (in hPAECs), and PI3K/AKT signaling (in hPASMCs). These results help us to better understand the pathophysiological consequences of KCNK3 dysfunction in pulmonary vascular cells and their implications in PAH pathogenesis. In PAH, PAECs dysfunction is characterized by the impairment of endothelial-dependent vasodilatation, by a reduction in anticoagulant properties, by metabolic changes, by the production of reactive oxygen species, and by an unadapted release of pro-inflammatory molecules. These dysfunctions result in PAECs phenotypic changes, including the decreased capacity for vascular tube formation, increased aerobic glycolysis, the loss of several endothelial markers, the acquisition of several mesenchymal markers and a pro-inflammatory phenotype, and increased *in vitro* hPAECs proliferation [9]. Consequently to PAEC dysfunction, hPASMCs are deregulated and characterized by enhanced proliferation, survival, vasoconstriction, and cell movement in PAH [9].

We recently found that *KCNK3* knockdown is associated with ERK-1/2 activation, HIF1α stabilization, and the over-phosphorylation of AKT, promoting the proliferation of control hPASMCs [8]. Here, with our analysis we found that *Kcnk3* deficiency is in favor of cell spreading, cell movement, and cell invasion, as well as some canonical pathways linked to cell proliferation (mTOR, PI3K/AKT) and DNA damage. These functions have been well described to promote cancer and tumor development [17]. Based on numerous points of similarity, PAH has emerged as a cancer-like disease, and is characterized by abnormal cell proliferation, aberrant resistance to apoptosis, and the deregulation of cellular metabolism [17], providing new concepts and new therapeutic perspectives for PAH. A large spectrum of growth factors, cytokines, and chemokines has been demonstrated to promote or to initiate PAH and cancer, including platelet-derived growth factor (PDGF) and interleukin 6 (IL-6) [18]. We found that the knockdown of KCNK3 promotes the proliferation of control hPASMCs [8]

In the absence of KCNK3, the control hPAECs proliferation rate was unchanged compared to the siControl conditions (not shown); however, the consequence of the KCNK3 loss of expression in the phenotype of hPAECs is unknown.

4.1. HO-1 Relevance in PAH

Common to hPASMCs and hPAECs, we found that *KCNK3* knockdown deregulated the canonical pathway, EIF2 (eukaryotic initiation factor 2) signaling, and eIF4 and p70S6K signaling. EIF2 is crucial for protein synthesis and the initiator binding of tRNA to the ribosome. EIF2 signaling is known to play a critical role in the vascular remodeling and proliferation of PASMCs in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension [19], as well as in pulmonary vein occlusive disease [12]. EIF2 signaling is a part of the integrated stress response (ISR). To restore cellular homeostasis, eukaryotic cells activate a common adaptive pathway in response to stress stimuli. ISR is mediated by several ISR kinases (GCN2, PERK, HRI), and the protein kinase R (PKR)—also named EIF2AK2—is known to phosphorylate the α-subunit of eIF2α, leading to the activation of activating transcription factor 4 (ATF4). ATF4 is known to induce the expression of other transcription factors, including HO-1 [12]. Here, we found that EIF2AK2 is reduced in hPASMCs and hPAECs transfected with siKCNK3. Additionally, in hPASMCs we found that the co-effector of GCN2 (general control nonderepressible 2, another ISR kinase), GCN1, is upregulated in the absence of KCNK3 (Supplementary Table S2). GCN2/GCN1 senses amino acid deficiency and modulates amino acid metabolism as a response to nutrient deprivation [20]. Heme oxygenase-1 (HO-1) is a stress-inducible enzyme HO-1 which maintains cellular homeostasis under stress conditions [21]. HO-1 is well established to play a crucial role in the cell adaptive response to oxidative and cellular stresses, increasing cell proliferation and cell angiogenesis and reducing inflammation and apoptosis [22]. Here, we found that HO-1 was overexpressed in hPASMCs and hPAECs transfected with siKCNK3. HO-1 plays a crucial role in the survival of vascular smooth muscle [23], and could play major role in many human diseases, including pulmonary veino-occlusive disease [12,22]. HO-1 promotes cancer development, since HO-1 overexpression is observed in different types of cancers promoting cell survival [24], while the inhibition of HO-1 reduces cell viability [25]. HO-1 is also described to regulate endothelial-to-mesenchymal transition [26], which is described to contribute to PH pathobiology [27] in relation to *Kcnk3* deficiency in rats [8]. In vascular smooth muscle cells, Liu et al. found that ER stress mediates HO-1 overexpression via the antioxidant response element (ARE), promoting the suppression of apoptosis [28]. NRF2 is the major transcription factor that promotes the ARE pathway [29], and here we found that the NRF2-mediated oxidative stress response is deregulated in *KCNK3*-knockdown hPAECs and hPASMCs, indicating that the loss of KCNK3 is a key signal to activate this pathway and promote cell survival. We also found that *KCNK3* knockdown leads to a reduced EIF2AK2 expression and the overexpression of HO-1, which should lead to increased biliverdin and bilirubin. An elevated serum bilirubin content is found to be a risk factor for death in PAH patients [30]. Moreover, HO-1 activity cleaves the heme to form equimolar ferrous ions, biliverdin-Ixα, and carbon monoxide (CO) [31–33]. The toxic properties of CO are well known in pulmonary medicine; CO replaces O2 from hemoglobin, causing tissue hypoxia [34]. At high CO concentrations, there are other mechanisms of CO-induced toxicity, including apoptosis and lipid peroxidation [35]; however, at low concentrations, CO contributes to several physiological reactions. Indeed, CO activates soluble guanylate cyclase (sGC), inducing the production of cyclic 3′:5′-guanosine monophosphate (cGMP) [36].

The sGC/cGMP pathway mediates the effects of CO on smooth muscle cell relaxation [36,37]. CO-induced vascular relaxation could be directly mediated by the activation of calcium-dependent potassium channels (BKCa) [38,39], which could be a compensatory mechanism in the context of KCNK3 dysfunction.

4.2. Interferon Signaling Relevance in PAH

The interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats (IFIT) gene family has been well studied for their antiviral properties [40]. In most cell types without viral infection, IFIT gene expression is involved in several biological processes, such as virus-induced translation initiation, replication, and double-stranded RNA signaling [41]. The expression of IFIT genes is enhanced by interferon treatment and viral infection [42]. In this study, we found by the LS/MS approach that the IFIT protein family (IFIT1, IFIT3, IFIT5, IFITX) is reduced in hPASMCs and hPAECs transfected with siKCNK3, and by a larger extent in hPAECs. Additionally, we confirmed the reduction in IFIT3 expression by Western blot experiments, indicating that KCNK3 dysfunction leads to IFIT family down-expression. IFIT genes are involved in the response to viral infection as well as KCNK3. In fact, the overexpression of KCNK3 reduces the ability of the HIV-1 accessory protein (Vpu) to release viral particles, while Vpu is described to abolish the TASK-1 current [43]. HIV-1 exploits the host miRNA cellular systems reduce to block the mechanism of innate inhibition. HIV-1 regulates miR-21, which is known to downregulate the KCNK3 expression, allowing a stronger infection efficiency [44]. HIV infection confers an increased risk for a variety of infectious lung diseases, and HIV infection is an established risk factor for PH. The prevalence of PAH is several-fold higher in HIV-infected patients compared with the PH population [45]. Our results suggest that the loss of function of KCNK3 could facilitate PAH in HIV-infected patients.

Due to their antiviral, immunomodulatory, and antitumor properties, interferon type I (IFN1) is naturally overexpressed in the human body in response to pathogens and in tumor cells. We found in a PAH lung increased interferon receptor 1 (IFNAR1) protein levels. We also found that *Ifnar1*$^{-/-}$ mice were protected against the development of PH [46], indicating that IFN1 contributes to PAH pathogenesis. The benefits of IFN therapy in combination with chemotherapy and radiotherapy is well documented for several types of cancers. However, it was also reported that IFN therapy has several side effects, triggering PAH [46,47].

4.3. KCNK3 Dysfunction and Superpathway of Methionine Degradation

Here, we found an increase in glycolysis and a decrease in the superpathway of methionine degradation in *KCNK3*-knockdown hPAECs, indicating that the loss of expression of KNCK3 facilitates the glycolysis metabolic shift of hPAECs. In most cancers, enzymes responsible for the Methionine (Met) cycle are altered [48]. Met is also crucial for RNA and protein synthesis, and polyamine [49]. Polyamines increase cell proliferation by reducing cell apoptosis [50].

The effect of Met restriction leads to the inhibition of IGF signaling and mTOR, and a reduction in mitochondrial oxidative stress [51]. In the present study, we found that the superpathway of Met degradation is reduced in hPAECs transfected with siKCNK3, suggesting that the loss of KCNK3 increases the pool of Met by reducing their degradation pathway, which could lead to the activation of the mTOR signaling pathway. Indeed, we also found an activation of the mTOR signaling pathway in *KCNK3*-knockdown hPAECs. The overactivation of the mTOR pathway is well known to contribute to PAH pathogenesis, and the in vivo inhibition of mTOR by rapamycin reduces the development experimental PH [52]. Moreover, mTOR is a part of the PI3K/AKT/mTOR pathway, which we found to be increased in lungs from *Kcnk3*-mutated rats as well as in human PAH [8,10].

Patients with hypermethioninemia exhibit a lot of symptoms, including neurological problems, sluggishness, muscle weakness, liver problems, and unusual breath [53]. A high level of Met could hypermethylate DNA and then produce undesirable epigenetic effects. DNA methylation contributes to the pathogenesis of pulmonary diseases, including cancer and PAH [54], in particular by promoting phenotypic changes in hPAECs in PAH [55]. Alterations in the DNA methylation of the *SOD2* gene (Superoxyde dismutase 2) are known to reduce the expression of SOD2, which is related to pulmonary vascular cell proliferation, apoptosis resistance, and cell metabolic changes [56]. Here, common to hPAECs and hPASMCs, we found that KCNK3 knockdown reduces the expression of SOD2, supporting the role of KCNK3 in promoting PAH via aberrant DNA methylation.

Moreover, in hPAECs (but not in hPASMCs) transfected with siKCNK3, we found a decrease in the expression of gamma-glutamyl hydrolase (GGH). GGH is involved in the turnover of cellular folates, since a reduction in the GGH expression increases the cellular folate content and poly-gamma glutamate. In lung adenocarcinoma, the GGH expression was lower and correlated with higher folate concentrations and increased DNA methylation [57]. In the context of KCNK3 dysfunction and PAH, a downregulation of GGH may have significant implications for the pulmonary vascular cell phenotype.

4.4. KCNK3 Dysfunction and Cell Metabolism Changes

In siKCNK3 transfected hPAECs and hPASMCs, we found by the LC/MS approach an activation of glycolysis. PAH pulmonary vascular cells and cancer cells have developed some similar metabolic adaptations [18]. Several studies have shown an increase in glycolysis and a decrease in glucose oxidation in pulmonary vascular cells, similar to the metabolic changes described in proliferating tumor cells [18]. These metabolic changes include the pentose phosphate pathway, glutaminolysis, and fatty acid synthesis and oxidation. In PAH pulmonary vascular cells and in cancer cells, this metabolic shift is mostly driven by HIFs overactivation [18]. Additionally, we recently demonstrated that KCNK3 dysfunction in human and rat PASMCs induces the overexpression of HIF1α [8].

Moreover, we found that *KCNK3* knockdown in hPASMCs induced a significant reduction in the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression, which is the main producer of NADPH. Clinical reports connect G6PD deficiency with PAH [58]. More, three patients with missense mutations in the G2PD gene were identified in a cohort of PAH patients [59]. Altogether, these reports indicate that G6PD dysfunction could predispose one to the development of PAH. Unexpectedly, an increase in G6PD activity is reported in chronic hypoxia rats [60]. The loss of G6PD was shown to prevent the production of NADPH and a subsequent decrease in NO synthesis, since reduced NADPH is a critical substrate for NO synthesis [61]. These data suggest that the inhibition of G6PD could be deleterious to the PA tone in PH. This is consistent with our recent results, showing that *Kcnk3* deficiency in rats is associated with significant alteration in PA tone, including the impairment of NO-induced relaxation [8].

Limitations: Due to the low capability of mass spectrometry to identify hydrophobic channel proteins, which are particularly nonpolar and present in a very limited amount, unfortunately we did not detect a large amount of ion channel families' proteins. However, 33 ion channels or transporters in hPAECs and 28 in hPASMCs (data not shown) were identified without any changes in their expression in the absence of KCNK3.

In the future, the expression of other newly identified signaling pathways will be further investigated by Western blot or PCR analysis in the context of the KCNK3 loss of expression as well as in the more general context of PAH.

In summary, the current study analyses the molecular functional consequences of KCNK3 dysfunction in hPASMCs and hPAECs. Altogether, these findings allow us to better understand the involvement of KCNK3 dysfunction in PAH disease.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7400/s1.

Author Contributions: Conceptualization: F.A.; Funding acquisition F.A.; Investigation: H.L.R., M.L., T.B., O.M., F.A.; Formal analysis: H.L.R., F.D., G.R., S.Y.-N.; Software: F.D., T.B., G.R. and M.Q.; Supervision: V.C., F.A.; Writing—original draft: F.A.; Writing—review and editing: H.L.R., F.D., B.G., S.C.-K., S.Y.-N., M.H., D.M., V.C., F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the Université Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, and the French National Agency for Research (ANR) (grant no. ANR-18-CE14-0023 (KAPAH). H.L.R is supported by ANR-18-CE14-0023. M.L. is supported by the Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569). The Region Ile de France has co-funded proteomic instruments (convention n° EX024607).

Acknowledgments: The authors thank Yvonne Dutheil from INSERM U999, Hopital Marie Lannelongue, for all her help.

Conflicts of Interest: The sponsors had no role in the design, collection, analysis, or interpretation of data, the writing of this article, or the decision to submit it for publication. M.H. and D.M have relationships with drug companies, including Actelion, Bayer, GSK, Novartis, and Pfizer. In addition to being investigators in trials involving these companies, other relationships include consultancy services and memberships to scientific advisory boards. The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ma, L.; Roman-Campos, D.; Austin, E.D.; Eyries, M.; Sampson, K.S.; Soubrier, F.; Germain, M.; Trégouët, D.-A.; Borczuk, A.; Rosenzweig, E.B.; et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *New Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 351–361. [CrossRef]
2. Lambert, M.; Capuano, V.; Olschewski, A.; Sabourin, J.; Nagaraj, C.; Girerd, B.; Weatherald, J.; Humbert, M.; Antigny, F. Ion channels in pulmonary hypertension: A therapeutic interest? *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3162. [CrossRef] [PubMed]
3. Lau, E.M.; Giannoulatou, E.; Celermajer, D.S.; Humbert, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* **2017**, *14*, 603–614. [CrossRef] [PubMed]
4. Simonneau, G.; Montani, D.; Celermajer, D.S.; Denton, C.P.; Gatzoulis, M.A.; Krowka, M.; Williams, P.G.; Souza, R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801913. [CrossRef] [PubMed]
5. Olschewski, A.; Veale, E.L.; Nagy, B.M.; Nagaraj, C.; Kwapiszewska, G.; Antigny, F.; Lambert, M.; Humbert, M.; Czirják, G.; Enyedi, P.; et al. TASK-1 (KCNK3) channels in the lung: From cell biology to clinical implications. *Eur. Respir. J.* **2017**, *50*, 1700754. [CrossRef] [PubMed]
6. Enyedi, P.; Czirják, G. Molecular background of leak K + currents: Two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 559–605. [CrossRef] [PubMed]
7. Antigny, F.; Hautefort, A.; Meloche, J.; Belacel-Ouari, M.; Manoury, B.; Rucker-Martin, C.; Péchoux, C.; Potus, F.; Nadeau, V.; Tremblay, E.; et al. Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **2016**, *133*, 1371–1385. [CrossRef] [PubMed]
8. Lambert, M.; Capuano, V.; Boet, A.; Tesson, L.; Bertero, T.; Nakhleh, M.K.; Remy, S.; Anegon, I.; Péchoux, C.; Hautefort, A.; et al. Characterization of Kcnk3-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 678–695. [CrossRef]
9. Humbert, M.; Guignabert, C.; Bonnet, S.; Dorfmüller, P.; Klinger, J.R.; Nicolls, M.R.; Olschewski, A.J.; Pullamsetti, S.S.; Schermuly, R.T.; Stenmark, K.R.; et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: State of the art and research perspectives. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801887. [CrossRef]
10. Sankhe, S.; Manousakidi, S.; Antigny, F.; Ataam, J.A.; Bentebbal, S.; Ruchon, Y.; Lecerf, F.; Sabourin, J.; Price, L.; Fadel, E.; et al. T-type Ca^{2+} channels elicit pro-proliferative and anti-apoptotic responses through impaired PP2A/Akt1 signaling in PASMCs from patients with pulmonary arterial hypertension. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenerg.* **2017**, *1864*, 1631–1641. [CrossRef]
11. Perros, F.; Ranchoux, B.; Izikki, M.; Bentebbal, S.; Happé, C.; Antigny, F.; Jourdon, P.; Dorfmüller, P.; Lecerf, F.; Fadel, E.; et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2015**, *65*, 668–680. [CrossRef] [PubMed]
12. Manaud, G.; Nossent, E.J.; Lambert, M.; Ghigna, M.-R.; Boët, A.; Vinhas, M.-C.; Ranchoux, B.; Dumas, S.J.; Courboulin, A.; Girerd, B.; et al. Comparison of human and experimental pulmonary veno-occlusive disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2020**, *63*, 118–131. [CrossRef]
13. Belouah, I.; Bénard, C.; Denton, A.; Blein-Nicolas, M.; Balliau, T.; Teyssier, E.; Gallusci, P.; Bouchez, O.; Usadel, B.; Zivy, M.; et al. Transcriptomic and proteomic data in developing tomato fruit. *Data Brief.* **2020**, *28*, 105015. [CrossRef] [PubMed]
14. Langella, O.; Valot, B.; Balliau, T.; Blein-Nicolas, M.; Bonhomme, L.; Zivy, M. X!TandemPipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *J. Proteome Res.* **2016**, *16*, 494–503. [CrossRef] [PubMed]
15. Valot, B.; Langella, O.; Nano, E.; Zivy, M. MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics* **2011**, *11*, 3572–3577. [CrossRef] [PubMed]
16. Krämer, A.; Green, J.; Pollard, J.; Tugendreich, S. Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. *Bioinformatics* **2013**, *30*, 523–530. [CrossRef]

17. Boucherat, O.; Vitry, G.; Trinh, I.; Paulin, R.; Provencher, S.; Bonnet, S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **2017**, *7*, 285–299. [CrossRef]
18. 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. [CrossRef]
19. Wang, A.-P.; Li, X.-H.; Yang, Y.-M.; Li, W.-Q.; Zhang, W.; Hu, C.-P.; Zhang, Z.; Li, Y.-J. A critical role of the mTOR/eIF2α pathway in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0130806. [CrossRef]
20. Anda, S.; Zach, R.; Grallert, B. Activation of Gcn2 in response to different stresses. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182143. [CrossRef]
21. Agarwal, A.; Nick, H.S. Renal response to tissue injury: Lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, *11*, 965–973. [PubMed]
22. Dulak, J.; Deshane, J.; Jozkowicz, A.; Agarwal, A. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: Focus on angiogenesis. *Circulation* **2008**, *117*, 231–241. [CrossRef] [PubMed]
23. Liu, X.; Wei, J.; Peng, D.H.; Layne, M.D.; Yet, S.-F. Absence of heme oxygenase-1 exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice. *Diabetes* **2005**, *54*, 778–784. [CrossRef] [PubMed]
24. Nitti, M.; Piras, S.; Marinari, U.M.; Moretta, L.; Pronzato, M.A.; Furfaro, A.L. HO-1 Induction in cancer progression: A matter of cell adaptation. *Antioxidants* **2017**, *6*, 29. [CrossRef] [PubMed]
25. Was, H.; Dulak, J.; Jozkowicz, A. Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 1551–1570. [CrossRef] [PubMed]
26. Chen, Y.; Yuan, T.; Zhang, H.; Yan, Y.; Wang, D.; Fang, L.; Lu, Y.; Du, G. Activation of Nrf2 attenuates pulmonary vascular remodeling via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition: An insight from a plant polyphenol. *Int. J. Biol. Sci.* **2017**, *13*, 1067–1081. [CrossRef]
27. Stenmark, K.R.; Frid, M.; Perros, F. Endothelial-to-mesenchymal transition. *Circulation* **2016**, *133*, 1734–1737. [CrossRef]
28. Liu, X.-M.; Peyton, K.J.; Ensenat, D.; Wang, H.; Schafer, A.I.; Alam, J.; Durante, W. Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. *J. Boil. Chem.* **2004**, *280*, 872–877. [CrossRef]
29. Krajka-Kuźniak, V.; Paluszczak, J.; Baer-Dubowska, W. The Nrf2-ARE signaling pathway: An update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment. *Pharmacol. Rep.* **2017**, *69*, 393–402. [CrossRef]
30. Xu, X.-Q.; Lv, Z.-C.; Liu, Q.-Q.; Zhao, Q.-H.; Wu, Y.; Sun, K.; Jiang, X.; Wang, L.; Peng, F.-H.; Jing, Z.-C. Direct bilirubin: A new risk factor of adverse outcome in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* **2017**, *228*, 895–899. [CrossRef]
31. Tenhunen, R.; Marver, H.S.; Schmid, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Boil. Chem.* **1969**, *244*, 6388–6394.
32. Slebos, D.-J.; Ryter, S.W.; Choi, A.M.K. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine. *Respir. Res.* **2003**, *4*, 7. [CrossRef] [PubMed]
33. Ryter, S.W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *678*, 108186. [CrossRef]
34. Piantadosi, C.A. Carbon monoxide poisoning. *New Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1054–1055. [CrossRef] [PubMed]
35. Weaver, L.K. Carbon monoxide poisoning. *Crit. Care Clin.* **1999**, *15*, 297–317. [CrossRef]
36. Duckers, H.J.; Boehm, M.; True, A.L.; Yet, S.-F.; San, H.; Park, J.L.; Webb, R.C.; Lee, M.-E.; Nabel, G.J.; Nabel, E.G. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 693–698. [CrossRef]
37. Morita, T.; Mitsialis, S.A.; Koike, H.; Liu, Y.; Kourembanas, S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J. Boil. Chem.* **1997**, *272*, 32804–32809. [CrossRef]
38. Zhang, L.; Bouadjel, K.; Manoury, B.; Vandecasteele, G.; Fischmeister, R.; Leblais, V. Cyclic nucleotide signalling compartmentation by PDEs in cultured vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 1780–1792. [CrossRef]
39. Manoury, B.; Idres, S.; Leblais, V.; Fischmeister, R. Ion channels as effectors of cyclic nucleotide pathways: Functional relevance for arterial tone regulation. *Pharmacol. Ther.* **2020**, *209*, 107499. [CrossRef]

40. Fensterl, V.; Sen, G.C. Interferon-induced IFIT proteins: Their role in viral pathogenesis. *J. Virol.* **2014**, *89*, 2462–2468. [CrossRef]
41. Fensterl, V.; Sen, G.C. The ISG56/IFIT1 Gene family. *J. Interf. Cytokine Res.* **2011**, *31*, 71–78. [CrossRef] [PubMed]
42. Pidugu, V.K.; Pidugu, H.B.; Wu, M.-M.; Liu, C.-J.; Lee, T.-C. Emerging functions of human IFIT proteins in cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, *6*, 148. [CrossRef] [PubMed]
43. Hsu, K.; Seharaseyon, J.; Dong, P.; Bour, S.; Marbán, E. Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 259–267. [CrossRef]
44. Farberov, L.; Herzig, E.; Modai, S.; Isakov, O.; Hizi, A.; Shomron, N. MicroRNA-mediated regulation of p21 and TASK1 cellular restriction factors enhances HIV-1 infection. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 1607–1616. [CrossRef]
45. Almodovar, S.; Hsue, P.Y.; Morelli, J.; Huang, L.; Flores, S.C. On behalf of the lung HIV study pathogenesis of HIV-associated pulmonary hypertension: Potential role of HIV-1 nef. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2011**, *8*, 308–312. [CrossRef]
46. George, P.M.; Oliver, E.; Dorfmüller, P.; Dubois, O.D.; Reed, D.M.; Kirkby, N.S.; Mohamed, N.A.; Perros, F.; Antigny, F.; Fadel, E.; et al. Evidence for the Involvement of Type I interferon in pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 677–688. [CrossRef]
47. Savale, L.; Sattler, C.; Günther, S.; Montani, D.; Chaumais, M.C.; Perrin, S.; Jaïs, X.; Seferian, A.; Jovan, R.; Bulifon, S.; et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated with interferon. *Eur. Respir. J.* **2014**, *44*, 1627–1634. [CrossRef]
48. Cavuoto, P.; Fenech, M. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 726–736. [CrossRef]
49. The Role of Methionine in Cancer Growth and Control. Available online: https://www.naturalmedicinejournal.com/journal/2015-12/role-methionine-cancer-growth-and-control (accessed on 20 April 2020).
50. Gerner, E.W.; Meyskens, F.L., Jr. Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 781–792. [CrossRef]
51. Santos, J.; Leitão-Correia, F.; Sousa, M.J.; Leão, C. Dietary restriction and nutrient balance in aging. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2015**, *2016*, 1–10. [CrossRef]
52. Houssaïni, A.; Abid, S.; Mouraret, N.; Wan, F.; Rideau, D.; Saker, M.; Marcos, E.; Tissot, C.-M.; Dubois-Randé, J.-L.; Amsellem, V.; et al. Rapamycin reverses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 568–577. [CrossRef] [PubMed]
53. Schweinberger, B.M.; Wyse, A.T. Mechanistic basis of hypermethioninemia. *Amino Acids* **2016**, *48*, 2479–2489. [CrossRef] [PubMed]
54. Gamen, E.; Seeger, W.; Pullamsetti, S.S. The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **2016**, *48*, 903–917. [CrossRef] [PubMed]
55. Hautefort, A.; Chesné, J.; Preussner, J.; Pullamsetti, S.S.; Tost, J.; Looso, M.; Antigny, F.; Girerd, B.; Riou, M.; Eddahibi, S.; et al. Pulmonary endothelial cell DNA methylation signature in pulmonary arterial hypertension. *Oncotarget* **2017**, *8*, 52995–53016. [CrossRef] [PubMed]
56. Archer, S.L.; Marsboom, G.; Cipriani, N.; Rehman, J.; Kim, G.; Zhang, H.J.; Toth, P.T.; Svensson, E.C.; Dyck, J.R.; Gomberg-Maitland, M.; et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: A basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* **2010**, *121*, 2661–2671. [CrossRef] [PubMed]
57. Kim, S.-E.; Hinoue, T.; Kim, M.S.; Sohn, K.-J.; Cho, R.C.; Cole, P.D.; Weisenberger, D.J.; Laird, P.W.; Kim, Y.-I. γ-Glutamyl hydrolase modulation significantly influences global and gene-specific DNA methylation and gene expression in human colon and breast cancer cells. *Genes Nutr.* **2014**, *10*, 444. [CrossRef]
58. Chen, L.Y.; Lai, E.J.; Collins, D.R.; Ostrow, D.N.; Sreenivasan, G.M. A young woman with episodic angioedema, papilledema, and eosinophilia. *Am. J. Hematol.* **2009**, *85*, 124–127. [CrossRef]
59. Kurdyukov, S.; Eccles, C.A.; Desai, A.A.; Gonzalez-Garay, M.L.; Yuan, J.X.-J.; Garcia, J.G.N.; Rafikova, O.; Rafikov, R. New cases of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in pulmonary arterial hypertension. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203493. [CrossRef]

60. Chettimada, S.; Gupte, R.; Rawat, D.; Gebb, S.A.; McMurtry, I.F.; Gupte, S.A. Hypoxia-induced glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression and -activation in pulmonary artery smooth muscle cells: Implication in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2014**, *308*, L287–L300. [CrossRef]
61. Leopold, J.A.; Cap, A.; Scribner, A.W.; Stanton, R.C.; Loscalzo, J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1771–1773. [CrossRef]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PROJET 2: SUR1 as a new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension

Auteurs: Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Dutheil M, Gooroochurn H, Böet A, Ghigna MR, De Montpreville V, Girerd B, Lambert M, Mercier O, Chung WK, Humbert M, Montani D, Capuano V, Antigny F

Etat : Accpeté à American Journal of Respiratory Cells and Molecular Biology (AJRCMB)

doi : 10.1165/rcmb.2021-0180OC

1. Rationnel

C'est en 2018 que Bohnen et al découvrent par whole exome sequencing, 12 mutations dans le gène *ABCC8* chez des patients atteints d'HTAP. Ces patients sont plus jeunes au diagnostic que les patients atteints d'HTAPi. *ABCC8* code pour SUR1, la sous unité régulatrice du canal K^+ sensible à l'ATP intracellulaire (KATP), SUR1/Kir6.2. Des analyses fonctionnelles de ces mutations par patch clamp ont révélé que 6 d'entre elles engendraient une perte de fonction du canal SUR1/Kir6.2. Ce canal n'avait jamais été étudié dans la circulation pulmonaire, il est principalement connu pour être exprimé dans le cœur, dans le cerveau et dans les cellules β du pancréas. En effet, le canal SUR1/Kir6.2 permet de réguler la sécrétion d'insuline et des mutations de *ABCC8* ou de *KCNJ11* qui code pour Kir6.2 sont connues pour entrainer des maladies telles que l'hyperinsulinisme ou le diabète. Cette découverte représente le deuxième cas de canalopathie dans l'HTAP après KCNK3. Depuis d'autres mutations ont été découvertes et à ce jour il en a été retrouvé 25.

Cependant, aucune étude n'a décrit l'expression et le rôle de ce canal dans les cellules vasculaires pulmonaires (CML-APs et CE-APs).

2. Objectif de l'étude

Le premier objectif de cette étude a été d'analyser l'expression du canal SUR1/Kir6.2 dans les poumons humains de patients contrôles et atteints d'HTAP, et plus précisément dans les CE-APs et CML-APs.

Le deuxième objectif a été de comprendre le rôle de ce canal dans les cellules vasculaires pulmonaires, notamment en regardant l'effet de l'activation ou de l'inhibition de ce canal *in vitro* sur la prolifération des CE-APs et CML-APs et également *ex-vivo* en regardant l'impact de cette activation sur les tonus des APs de rats contrôles et MCT et également dans les APs humaines de patients contrôles et HTAP.

Puis le dernier objectif a été de déterminer si l'activation de ce canal *in vivo* dans plusieurs modèles animaux d'HTP, permettait d'atténuer le développement de la maladie

3. Méthodes

Nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques sur coupe de poumons humains afin de visualiser l'expression et la localisation de SUR1 et Kir6.2 au niveau des APs. Des marquages par immunofluorescence ont également été réalisés pour évaluer la colocalisation de SUR1 et Kir6.2.

Des expériences de Western blot ont été réalisées sur des échantillons de poumons et APs humaines contrôles et HTAP, ainsi que des échantillons de CE-APs et CML-APs isolés de patients contrôles et atteints d'HTAP.

Pour les expériences *in vitro*, nous avons analysé la conséquence de l'activation de SUR1 par le diazoxide (100µM) sur la prolifération des CE-APs et CML-APs par un test d'incorporation du BrdU.

Pour les expériences de myographe, nous avons évalué *ex-vivo* la réactivité vasculaire des APs de rats contrôles et MCTen présence de diazoxide (activateur de SUR1) ou de nateglinide (inhibiteur de SUR1) ou DMSO.Nous avons également analysé la conséquence de l'activation de SUR1 par le diazoxide sur les APs humaines de patients contrôles et atteint d'HTAP.

De plus, nous avons également mesuré la relaxation des aortes de rats contrôles en présence des différents activateurs de SUR1 ainsi que du pinacidil (activateur de SUR2) et du DMSO.

Enfin, nous avons réalisé des expériences *in vivo* sur des rats males wistar de 100g exposés à la MCT ou exposés à l'hypoxie chronique et traités au diazoxide (20mg/kg/jour) ou au NN414 (1.5mg/kg/2xparjour) ou avec le DMSO en IP.

4. Résultats

Premièrement, nous avons démontré que les protéines SUR1 et Kir6.2 sont exprimées et que leurs expressions sont inchangées dans les poumons et APs de patients atteints d'HTAP.

Ensuite, par immunohistochimie nous avons mis en évidence que SUR1 et Kir6.2 sont localisés au niveau des CE-APs et des CML-APs dans des coupes de poumons de patients contrôles et HTAP. De plus, par co-marquages nous avons montré que SUR1 et Kir6.2 sont co-localisés dans les CE-APs et CML-APs.

Par western blot nous avons mesuré que l'expression de SUR1 est inchangée tandis que Kir6.2 est augmentée dans les CML-APs de patients atteints d'HTAP. De la même manière, l'expression de SUR1 est inchangée dans les CE-APs de patients atteints d'HTAP tandis que l'expression Kir6.2 est diminuée.

Nous avons mis en évidence que l'activation de SUR1/Kir6.2 entrainait une diminution de la prolifération des CML-APs et CE-APs contrôles.

Par des expériences de myographe sur des APs de rats contrôles ou traités à la MCT, nous avons mis en évidence que l'activation de SUR1/Kir6.2 entraine un décalage vers la droite de la courbe de contraction médiée par la dose réponse au KCL et à l'U46619. De plus, l'inhibition de SUR1/Kir6.2 par le nateglinide entraine un décalagede contraction vers la gauche pour la dose réponse U46619. Enfin, nous avons mis en évidence que l'activation pharmacologique de SUR1 induit la relaxation des APs de la même manière chez les rats contrôles et les rats MCT. Enfin, nous avons montré que l'activation du canal par le diazoxide induit une relaxation des APs humaines isolées de patients contrôles et atteints d'HTAP.

Finalement, par des expériences *in vivo* nous avons démontré que l'activation pharmacologique de SUR1 par le diazoxide (20mg/kg/jour) avec un traitement long (21J) dans le modèle MCT entrainait l'amélioration des paramètres hémodynamiques tels que les pressions sanguines systolique du VD (PVDs), le débit cardiaque et l'index de Fulton (ratio VD/VG+Septum) ainsi qu'une diminution du remodelage vasculaire pulmonaire et de la néo-muscularisation des vaisseaux distaux pulmonaires. L'activation à court terme de SUR1 par le diazoxide (7jours) dans le modèle de rat MCT ou en hypoxie chronique induit une diminution des PVDs ainsi que la néo-muscularisation des vaisseaux pulmonaires distaux.

Afin d'évaluer la « sureté » du diazoxide chez le rat, nous avons traité au diazoxide des rats contrôles pendant 21 jours et nous n'avons pas mesuré de différences hémodynamiques ni

d'altérations des vaisseaux pulmonaires chez les rats traités au diazoxide par rapport aux rats traités au DMSO.

Néanmoins, le diazoxide pouvant avoir d'autres cibles que SUR1, il peut notamment activer SUR2 à certaines concentrations, et il peut également affecter le potentiel de membrane des mitochondries. C'est pourquoi, nous avons testé d'autres molécules activatrices de SUR1 connues pour être plus spécifiques telles que le VU0071063 et le NN414. Nous avons montré que ces deux autres activateurs de SUR1 induisent la relaxation des APs de rats contrôles de la même manière que le diazoxide. Enfin, le traitement à court terme (7J) avec le NN414 dans le modèle de rat MCT a permis d'améliorer tous les paramètres hémodynamiques et de diminuer la néo-musuclarisation des APs.

5. Discussion

Par l'utilisation de plusieurs approches, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, nous avons pu démontrer que premièrement le canal SUR1/Kir6.2 est exprimé dans les CML-APs et CE-APs humaines. Deuxièmement, l'expression de ce canal n'est pas diminuée dans le contexte de l'HTAP ainsi que dans trois modèles expérimentaux d'HTP chez le rat. Troisièmement, nous avons montré que SUR1/Kir6.2 contribue au tonus des APs humaines et de rats dans des conditions contrôles et pathologiques. Quatrièmement, l'activation pharmacologique de SUR1 *in vivo* par le diazoxide n'altère pas les paramètres hémodynamiques des rats contrôles, validant la sureté de la molécule chez le rat. Cinquièmement l'activation pharmacologique de SUR1 permet la réduction du développement de l'HTP dans deux modèles expérimentaux d'HTP chez le rat.

SUR1 est connu pour s'assembler majoritairement avec Kir6.2, cependant il a été montré dans plusieurs tissus qu'il pouvait également s'associer avec Kir6.1. Nous avons regardé l'expression de Kir6.1 dans les poumons humains de patients atteints d'HTAP et dans les modèles expérimentaux de rats et n'avons pas observé de différences d'expression. SUR1 est également connu pour réguler le canal TRPM4 (transient receptor potential cation channel subfamily M member 4). Nous avons regardé l'expression de TRPM4 dans les poumons de patients atteints d'HTAP et de modèles expérimentaux d'HTP chez le rat et nous n'avons pas observé de modification de son expression. Cependant, nous pouvons supposer que SUR1 s'assemble avec TRPM4 dans les vaisseaux pulmonaires et que des mutations d'*ABCC8* dans l'HTAP peuvent modifier la fonction de TRPM4 dans les cellules vasculaires pulmonaires.

Nous avons mis en évidence que l'activation de SUR1 dans les CE-APs et CML-APs pouvait réduire leur prolifération uniquement pour les cellules contrôles. Cela suggère que le rôle de SUR1 au niveau des APs est lié à la régulation du tonus vasculaire. De plus, nous avons démontré par des expériences de myographe sur APs de rats avec endothélium dénudé qu'environ 20% de la relaxation venant de l'activation de SUR1 est dépendante des cellules endothéliales d'AP.

Il est connu que SUR1 et Kir6.2 sont exprimés dans le cœur humain. Il a été montré que des souris surexprimant SUR1 développent des arythmies et des fibrillations atriales(Flagg et al. 2007). Il a également été démontré que des souris déficientes pour *Kir6.2* ont une réduction de leur récupération cardiaque après un exercice et développement également des arythmies. Nous avons mis en évidence que l'ARNm de *ABCC8* est réduit dans le VD de patients atteints d'HTAP et de rats MCT. L'ARNm de *Kcnj11* est quant à lui réduit uniquement dans le VD de rats MCT. Au niveau protéique, SUR1 et Kir6.2 sont diminués dans le VD de rats MCT.

Dans le VG nous n'avons pas observé de changement d'expression de l'ARNm de *ABCC8* et *Kcnj11* bien que le niveau de protéines soit réduit dans le VG de rats MCT. Nous supposons la mise en place de mécanismes post transcriptionnel pouvant réguler négativement SUR1 et Kir6.2. Cette altération de l'expression de SUR1/Kir6.2pourrait avoir un impact sur la dysfonction ventriculaire droite observée dans l'HTAP néanmoins aucune étude n'a montré le rôle fonctionnel de ce canal au niveau du ventricule droit.

Malgré les mutations d'*ABCC8* mises en évidence chez les patients atteints d'HTAP, nous avons démontré que l'expression de SUR1 et Kir6.2 n'est pas altérée dans les poumons de patients atteints d'HTAP idiopathiques et héritables ainsi que dans les modèles animaux d'HTP. Cette découverte est assez surprenante puisque beaucoup de canaux K^+ ont été retrouvés diminués dans l'HTAP comme plusieurs canaux Kv (Kv1..1 , Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1)(Lambert, Capuano, et al. 2018). De plus, il a été décrit depuis 2013 18 mutations de *KCNK3* chez les patients atteints d'HTAP. Il a également été démontré au laboratoire que la perte d'expression et de fonction de KCNK3 est un marqueur de l'HTAP, retrouvée dans plusieurs formes d'HTAP ainsi que dans différents modèles animaux d'HTP(Antigny et al. 2016). Cela montre la difficulté de pouvoir activer les canaux K^+ dans l'HTAP puisque leur expression est généralement perdue et suggère que SUR1 n'étant pas affecté dans l'HTAP, pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Des mutations *ABCC8* sont la cause d'hyperinsulinisme chez l'homme. Ces patients sont traités avec du diazoxide. C'est pourquoi nous avons utilisé cet activateur de SUR1 pour étudier son

rôle dans l'HTAP(Black 1968). De plus, une ancienne étude avait montré que l'adiministration de diazoxide à des patients atteints d'HTAP entrainait la réduction de la PAPm(N. S. Chan, McLay, et Kenmure 1987). De plus, nous avons démontré que l'exposition au diazoxide 21 jours sur des rats contrôles n'altérait pas les paramètres hémodynamiques des rats exposés au diazoxide.

Néanmoins, plusieurs cas ont été rapportés de nouveau-nés hyperinsulinemiques traités au diazoxide qui ont développé une HTAP réversible à l'arrêt du traitement(S. C. Chen et al. 2019). Une récente étude a montré qu'il existait une dose seuil ou le diazoxide pouvait être toxique. Cette étude suggère qu'un traitement des enfants hyperinsulinémiques en dessous de 10mg/kg pourrait réduire ou arrêter les effets néfastes du diazoxide(Ohnishi et al. 2020). De plus, les potentiels effets indésirables du diazoxide pourraient également venir de son manque de spécificité pour SUR1. C'est pour cela que nous avons utilisé dans notre étude deux autres activateurs de SUR1, connus pour être plus spécifiques. L'étude de ces activateurs *ex-vivo* sur des APs de rats et *in-vivo* dans le modèle MCT nous a permis de démontrer que ces activateurs de SUR1 entrainent la vasorelaxation des APs de rats contrôles de la même manière que le diazoxide et que le traitement au NN414 de rats MCT améliore les paramètres hémodynamiques et diminue la néo-muscularisation des vaisseaux pulmonaires distaux. Ces résultats suggèrent ainsi que l'activation pharmacologique de SUR1 peut être une voie thérapeutique intéressante dans l'HTAP et que le NN414 pourrait être une molécule intéressante pour le traitement des patients atteints d'HTAP.

6. Conclusions

En conclusion, nous avons démontré que le canal SUR1/Kir6.2 contribue à la régulation du tonus vasculaire pulmonaire chez l'homme et le rat. L'expression de SUR1/Kir6.2 est maintenue dans les cellules vasculaires pulmonaires de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les modèles expérimentaux d'HTP. De plus, nous avons montré que l'activation pharmacologique *in vivo* de SUR1, par le diazoxide réduit le développement de l'HTP dans deux modèles expérimentaux. L'utilisation du NN414, un activateur plus sélectif de SUR1, a également montré son effet bénéfique chez les rats MCT. Toute cette étude montre que l'activation de SUR1 pourrait être une cible intéressante dans l'HTAP.

Check for updates

QA1
QA2

ORIGINAL RESEARCH

SUR1 As a New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension

Hélène Le Ribeuz[1,2], Bastien Masson[1,2], Véronique Capuano[1,2], Mary Dutheil[1,2,3], Hans Gooroochum[3], Angèle Boët[1,2], Maria-Rosa Ghigna[1,2,3], Vincent De Montpreville[3], Barbara Girerd[1,2,4], Mélanie Lambert[1,2], Olaf Mercier[1,2,5], Wendy K. Chung[6], Marc Humbert[1,2,4], David Montani[1,2,4], and Fabrice Antigny[1,2]

1 2 [1]Faculté de Médecine, School of Medicine, Université Paris-Saclay, Paris, France; [2]INSERM UMR_S 999 Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies, [3]Department of Pathology, and [5]Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph-Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; [4]Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Department of Respiratory and Intensive Care Medicine, Pulmonary Hypertension National Referral Center, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; and [6]Columbia University, New York, New York

ORCID IDs: 0000-0003-0703-2892 (M.H.); 0000-0002-9358-6922 (D.M.); 0000-0002-9515-6571 (F.A.).

Abstract

3 Mutations in *ABCC8* have been identified in pulmonary arterial hypertension (PAH). *ABCC8* encodes SUR1, a regulatory subunit of the ATP-sensitive potassium channel Kir6.2. However, the pathophysiological role of the SUR1/Kir6.2 channel in PAH is unknown. We hypothesized that activation of SUR1 could be a novel potential target for PAH. We analyzed the expression of SUR1/Kir6.2 in the lungs and pulmonary artery (PA) in human PAH or experimental pulmonary hypertension (PH). The contribution of SUR1 in human or rat PA tone was evaluated, and we measured the consequences of *in vivo* activation of SUR1 in control and PH rats. SUR1 and Kir6.2 protein expression was not reduced in the lungs or human pulmonary arterial endothelial cells and smooth muscle cells from PAH or experimentally induced PH. We showed that pharmacological activation of SUR1 by three different SUR1 activators (diazoxide, VU0071063, and NN414) leads to PA relaxation. Conversely, the inhibition of SUR1/Kir6.2 channels causes PA constriction. *In vivo*, long- and short-term activation of SUR1 with diazoxide reversed monocrotaline-induced PH in rats. In addition, *in vivo* diazoxide application (short protocol) reduced the severity of PH in chronic-hypoxia rats. Moreover, 3 weeks of diazoxide exposure in control rats had no cardiovascular effects. Finally, *in vivo*, activation of SUR1 with NN414 reduced monocrotaline-induced PH in rats. In PAH and experimental PH, the expression of SUR1/Kir6.2 was still present. *In vivo* pharmacological SUR1 activation by two different molecules alleviated experimental PH, providing proof of concept that SUR1 activation should be considered for PAH and evaluated more thoroughly.

Keywords: SUR1; ABCC8; pulmonary arterial tone; nateglinide

Clinical Relevance

Recently identified mutations in *ABCC8* encoding SUR1 in pulmonary arterial hypertension (PAH) highlighted a novel potential target. We provide proof of concept that pharmacological activation of SUR1 should be considered in PAH. The use of more specific SUR1 activators (NN414) in humans could be helpful for PAH therapy.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease. At the last World Symposium on Pulmonary Hypertension (PH), PAH was defined as an elevation of the mean pulmonary artery (PA) pressure >20 mm Hg and by a pulmonary vascular resistance (PVR) >3 Wood units at rest. It is also defined as a PA wedge pressure ≤15 mm Hg (1). The prevalence of the disease is estimated to be between 15 and 50 cases per million (2). Increased PVR is the consequence of remodeling of the small PA

(Received in original form April 14, 2021; accepted in final form December 8, 2021)

Supported by grants from the French association, "Fédération Française de Cardiologie." This study was also supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research, the University of Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, and the Agence Nationale de la Recherche, grant ANR-18-CE14-0023 (KAPAH). H.L.R. is supported by ANR-18-CE14-0023. M.L. and B.M. are supported by Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Fabrice Antigny, Ph.D., INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. E-mail: fabrice.antigny@universite-paris-sacaly.fr.

Am J Respir Cell Mol Biol Vol ■■, Iss ■■, pp 1–16, ■■ ■■, 2022
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society
Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2021-0180OC on February 17, 2022
Internet address: www.atsjournals.org

Proof Only

Proof Only

(diameter < 500 μm), which results in right ventricular (RV) hypertrophy and right heart failure and death (3).

PAH is a complex and multifactorial disease. There is idiopathic PAH (iPAH, where the cause is unknown), heritable PAH (hPAH, due to identifiable genetic mutations or family history), PAH induced by drugs or toxins, and PAH associated with other diseases. During the last two decades, 18 PAH-predisposing genes have been identified in hPAH: *BMPR2*, *EIF2AK4*, *ACVRL1*, *TBX4*, *GDF2*, *SOX17*, *ENG*, *KCNK3*, *ABCC8*, *ATP13A3*, *SMAD9*, *AQP1*, *CAV1*, *BMP10*, *SMAD4*, *SMAD1*, *BMP9*, and *KDR* (4, 5).

In 2018, Bohnen and colleagues, using exome sequencing, discovered 12 different mutations in ATP-binding cassette subfamily C member 8 (*ABCC8*) in patients with PAH (6). The *ABCC8* gene encodes the SUR1 protein, a regulatory subunit of ATP-sensitive-K^+ channels (KATP). *ABCC8* mutation carriers are younger than those with iPAH (median age at diagnosis, 14 vs. 42 years old) (6). KATP channels, initially discovered in the heart, are characterized by inhibition of K^+ channels when the intracellular ATP concentration increases (7). Like all K^+ channels, KATP channels are crucial for membrane excitability and the cellular metabolic state and regulate many cellular functions, including hormone secretion, vascular tone, and cardiomyocyte contractility (8). KATP channels are composed of four Kir6.x (Kir6.1 and Kir6.2) channels and four sulfonylurea receptor subunits (SUR1, SUR2A, and SUR2B). SUR1 can coassemble and regulate Kir6.1 and Kir6.2 channels (9). In addition, some reports have suggested that SUR1 interacts with and regulates transient receptor melatonin 4 (TRPM4), a nonselective cationic channel (10). Electrophysiological recordings of Cos-7 cells overexpressing mutated *ABCC8* plus Kir6.2 channels demonstrated that 11 of 12 *ABCC8* mutations showed a loss of function of the KATP channel (6). *ABCC8* mutations are well known to cause neonatal diabetes and hyperinsulinism owing to the dysregulation of insulin secretion (11). SUR1/Kir6.2 channels in pancreatic cells regulate the resting membrane potential and indirectly regulate insulin secretion (12). However, the role of the SUR1/Kir6.2 channel in PAH physiopathology remains unknown and requires further investigation to elucidate a putative pathophysiological role of SUR1/Kir6.2 channels in the development of PAH.

In the present study, we hypothesized that pharmacological activation of SUR1 could reduce PH in an experimental model. We investigated the expression, localization, and function of SUR1 and Kir6.2 in patients with iPAH and hPAH without *ABCC8* mutations. Moreover, this approach was performed in three different experimental models of PH. We measured the role of SUR1/Kir6.2 channels in pulmonary arterial tone using organ bath studies in isolated PA from patients without PAH and patients with iPAH, and PA from control rats and the well-established monocrotaline (MCT)-induced PH rat model (MCT-PH). In addition, we evaluated the effect of specific pharmacological activation of SUR1 on the development of experimental PH.

Methods

A detailed description of the materials and methods is presented in the data supplement.

Results

The SUR1/Kir6.2 Channel Is Expressed in Lungs and PA from Patients with PAH

To assess the relative quantity of SUR1 and Kir6.2 in lung tissues, we performed Western blots using proteins from control patients and patients with iPAH (Figure 1A). We found that the SUR1 and Kir6.2 proteins were expressed at the same levels in iPAH and control lung tissues (Figure 1A). The protein expression of SUR1 and Kir6.2 was not different between PA isolated from control subjects and patients with iPAH (Figure 1B). We also found that SUR1 and Kir6.2 expression in the lungs of patients with hPAH (*BMPR2* mutations) was the same as that in the lungs of control subjects (*see* Figures E1A and E1B in the data supplement). Surprisingly, we found that the mRNA concentrations of *ABCC8* and *KCNJ11* (coding for Kir6.2) were increased in the lungs of patients with iPAH and hPAH compared with those of control subjects (Figure E1C). We found that the mRNA concentrations of *ABCC8* and *KCNJ11* were unchanged in PA isolated from patients with iPAH compared with control subjects (Figure E1D).

Then, we analyzed the localization of SUR1 and Kir6.2 by immunohistochemistry in paraffin-embedded lung sections of control subjects and patients with iPAH (Figures 1C and 1D). We found in both control subjects and patients with iPAH that SUR1 and Kir6.2 staining labeled pulmonary arterial endothelial cells (PAECs; blue arrow) and PASMCs (yellow arrow) (Figures 1C and 1D). Positive controls of SUR1 and Kir6.2 staining were used to validate the specificity of the primary antibodies in human pancreas tissues (Figure E2). In human lung sections, rabbit preimmune serum incubation gave negative immunostaining, as presented in Figure E2. Coimmunostaining against SUR1 and Kir6.2 in control and PAH PA confirmed that both proteins were colocalized, as highlighted by white arrows (Figures 1E and 1F).

The SUR1/Kir6.2 Channel Is Expressed in Human PA Endothelial Cells and PA Smooth Muscle Cells

As immunostaining is not quantitative, we used Western blot analysis to quantify the expression of SUR1 and Kir6.2 proteins in primary human PAECs (hPAECs) and primary human PASMCs (hPASMCs) from control patients and patients with iPAH. As illustrated in Figures 2A–2D, SUR1 and Kir6.2 proteins were expressed in cultured control and iPAH hPAECs as well as hPASMCs. Compared with control-PASMCs, SUR1 protein expression was unchanged, whereas Kir6.2 protein expression was increased in iPAH-hPASMCs

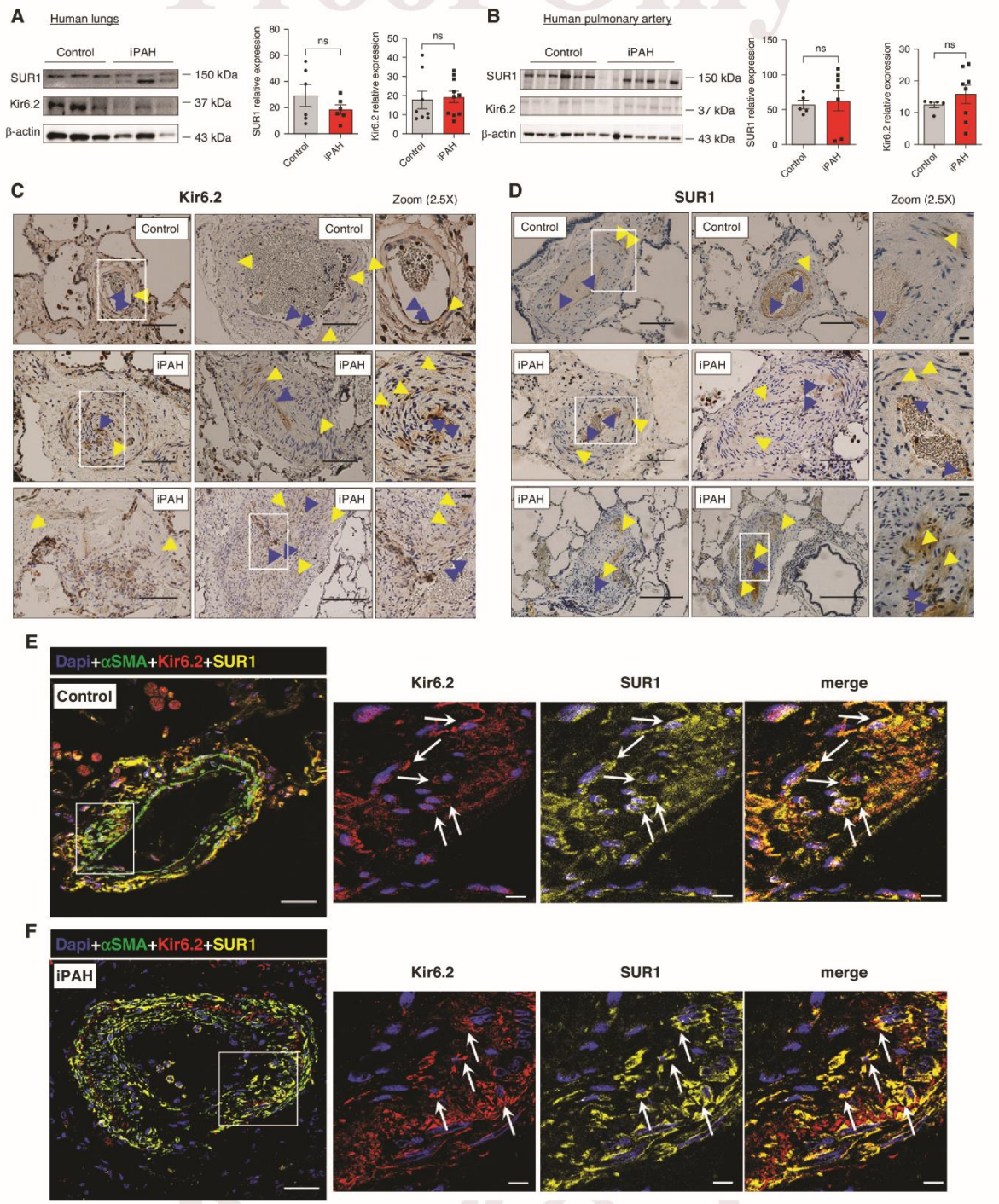
Author Contributions: Conception and design: H.L.R., V.C., A.B., M.-R.G, B.G., and F.A. Acquisition of data: H.L.R., B.M., V.C., M.D., H.G., A.B., M.-R.G., M.L., and F.A. Analysis and interpretation: H.L.R., B.M., V.C., H.G., A.B., M.-R.G., M.L., D.M., and F.A. Drafting of manuscript for important intellectual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

This article has a related editorial.

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

Proof Only

Proof Only



11 **Figure 1.** Expression of SUR1 and Kir6.2 proteins in pulmonary artery (PA) endothelial cells (PAECs) and PA smooth muscle cells (PASMCs) in control subjects and patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH). (*A*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in

Proof Only

Proof Only

(Figures 2A and 2B). Compared with control hPAECs, SUR1 protein expression was unchanged, whereas Kir6.2 was decreased in iPAH hPAECs (Figures 2C and 2D). Therefore, we evaluated the role of SUR1 in hPASMC and hPAEC proliferation after pharmacological activation of SUR1 with diazoxide for 24 hours. Interestingly, we found that pharmacological activation of SUR1 reduced the proliferation rate of control hPAECs and control hPASMCs without altering the proliferation of iPAH hPAECs and iPAH hPASMCs (Figures 2E and 2F).

Because diazoxide was also demonstrated to activate the SUR2A/Kir6.1 or SUR2B/Kir6.1 channel, we evaluated whether hPAECs and hPASMCs expressed these proteins. We found that SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 were also expressed in control and iPAH conditions (data not shown). Supplementary experiments are needed to decipher the role of the SUR2/Kir6.1 channel in the pulmonary vasculature and the pathophysiology of PAH.

Next, we evaluated the consequence of SUR1 activation on PA relaxation in control human patients (Figure 2G). PAs were precontracted by applying 1 μmol/L U46619 (thromboxane A2 mimetic). We found that the activation of SUR1 by diazoxide induced PA relaxation (by 16.50% ± 4.82%) compared with PA treated with DMSO (1.94% ± 1.17%). These results demonstrate that SUR1/Kir6.2 is functionally expressed in control PA and contributes to the regulation of PA tone.

Pharmacological Modulation of the SUR1/Kir6.2 Channel Modulates Rat and Human PA Tone

We assessed the role of SUR1/Kir6.2 in control rat PA tone using a pharmacological activator of SUR1, diazoxide, and an inhibitor of Kir6.2, nateglinide (Figure 3). Nateglinide inhibits SUR1/Kir6.2 channels with a high affinity for SUR2A/Kir6.2 and low affinity for SUR2B/Kir6.2 channels (13). As expected, the contractile response of PA in response to increasing doses of KCl (from 10 to 90 mmol/L) was significantly shifted to the right when PAs were preincubated with diazoxide, showing a delay of PA contraction compared with the PA contraction recorded under DMSO conditions (Figure 3A), indicated by the increase in Hillslope values (Figure 3B) and EC50 values (Figure 3C). The contractile responses of PA in response to increasing doses of U46619 (from 0.1 to 3 μmol/L) was significantly shifted to the right when PAs were preincubated with diazoxide (Figure E3A).

Next, we incubated PAs with nateglinide before the contractile dose–response to U46619 (Figure 3D). In the presence of nateglinide, we recorded a significant decrease in the Hillslope values (Figure 3E) and a significant decrease in the EC50 values (Figure 3F). However, the contractile response of PAs in response to increasing doses of KCl was not affected by the preincubation with nateglinide (Figure E3B). These data suggest that the pharmacological inhibition of SUR1 favors PA constriction in control rat PA.

Then, we measured SUR1-dependent PA relaxation in control isolated rat PA (Figures 3G and 3H). PAs were contracted with U46619 (1 μmol/L). After 15 minutes (stable contraction), we added DMSO with basal relaxation of PA for 10 minutes (9% ± 2.5% of relaxation), and then we added diazoxide for 10 minutes. Diazoxide application produced significant PA relaxation in control rat PA (48% ± 6.3%) (Figures 3G and 3H). These data suggest that the pharmacological activation of SUR1 leads to relaxation of the control rat PA. At the end of the experiments, the vitality of our PA was checked by an application of 100 mmol/L of KCl (Figure E3C).

Interestingly, the relaxation produced by diazoxide was similar to the relaxation mediated by acetylcholine (Figures E3D–E3F).

To determine the relative involvement of PAECs expressing SUR1 and PASMCs expressing SUR1 on PA relaxation, we evaluated the consequence of SUR1 activation on PA relaxation with or without endothelium. As presented in Figure E4, in the absence of endothelium and after preconstriction of PA with U46619, the relaxation mediated by diazoxide is reduced by 20% (Figure E4A), suggesting that the endothelial SUR1 also contributes to PA arterial tone. 6

Pharmacological Activation of SUR1 Produces PA Relaxation in MCT-PH Rats and Patients with PAH

We also measured the SUR1 and Kir6.2 protein concentrations in lung samples from MCT-PH rats (Figures 4A and 4B). In contrast to the human lung, we found that Kir6.2 and SUR1 expression was increased in MCT-PH rats compared with control rats. As to control PA, we found that the contractile response to increasing doses of KCl (from 10 to 90 mmol/L) in isolated PA from MCT-PH rats was significantly shifted to the right in the presence of diazoxide (Figure 4C), as indicated by increased Hillslope values (Figure 4D) and EC50 values (Figure 4E). In response to increasing doses of U46619, the PA contractile response from MCT-PH rats was significantly shifted to the left compared with control PA (Figure 4F). In PA from MCT-PH rats, in the presence of nateglinide, the contractile dose–response to U46619 was not significantly shifted to the left (Figures 4F–4H).

We also measured the consequence of SUR1 activation on the relaxation of PA from MCT-PH rats (Figure 4I). After induction of contraction by 1 μmol/L U46619, we added DMSO for 10 minutes (2.7% ± 1.90% relaxation) or diazoxide at 100 μmol/L. After applying diazoxide, we measured significant PA relaxation (by 43% ± 8.8% in MCT-PH and 48% ± 6.3% in control) compared with DMSO. The diazoxide-mediated PA relaxation was similar in control and MCT-isolated PA (Figure 4I). These data show that SUR1 is functionally expressed in PA from MCT-PH rats, and pharmacological activation of

Figure 1. (*Continued*). lungs from control subjects and patients with iPAH and quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in lungs from control subjects and patients with iPAH ($n = 9$–12). (*B*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in isolated PA from control subjects and patients with iPAH and quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in PA from control subjects and patients with iPAH ($n = 5$–7). (*C* and *D*) SUR1 or Kir6.2 immunostaining in paraffin-embedded lung sections from control subjects and patients with iPAH; PAEC (blue arrowheads) and PASMC (yellow arrowheads) staining is visible. Scale bars, 100 μm and 30 μm. (*E* and *F*) Coimmunostaining against Kir6.2, SUR1, and αSMA (smooth muscle marker) confirmed the colocalization (white arrow) of Kir6.2 and SUR1 in pulmonary vascular cells in control subjects and patients with iPAH. Scale bars, 50 μm and 10 μm. Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups. ns = nonsignificant. 12

Proof Only

Proof Only

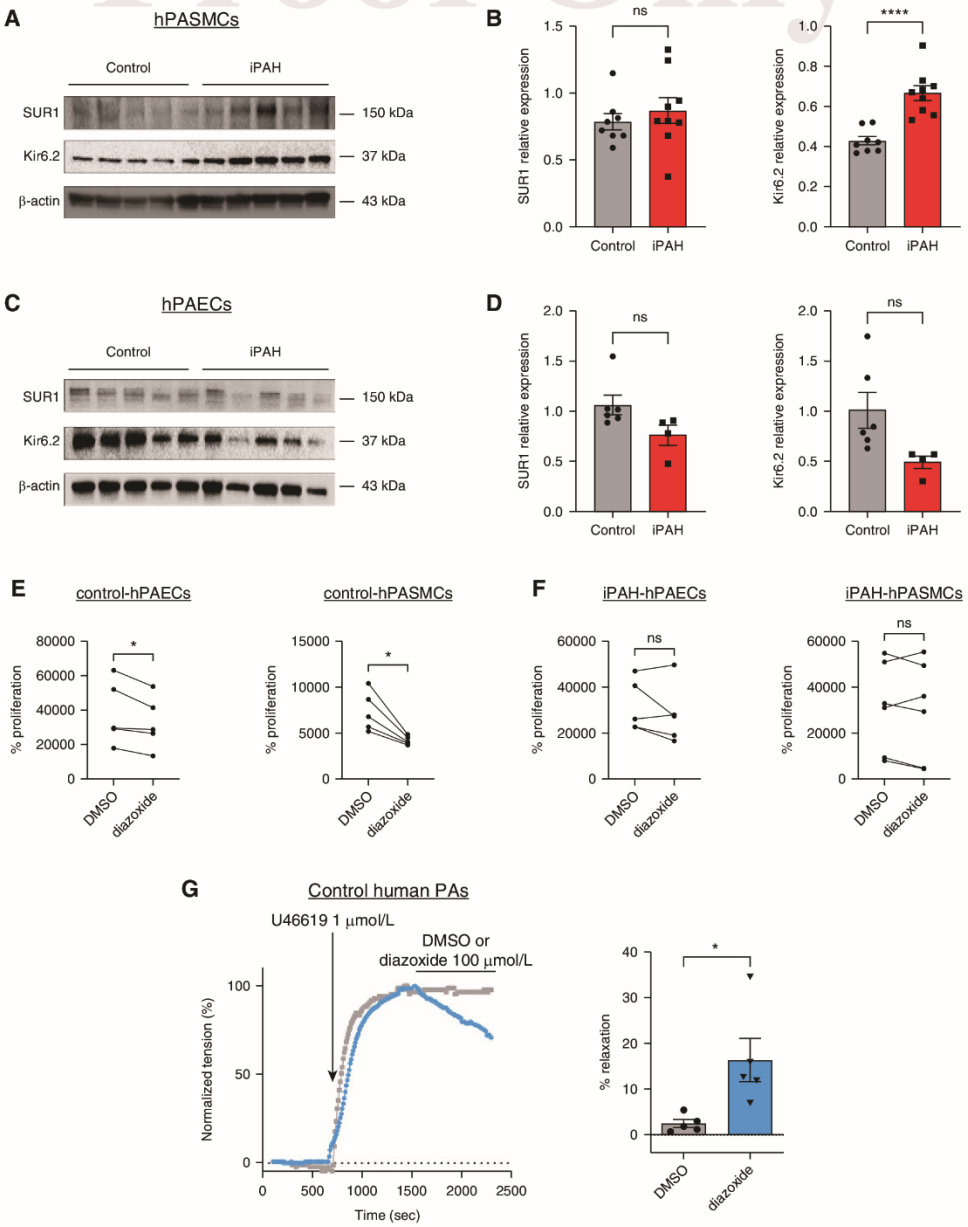


Figure 2. The SUR1/Kir6.2 expression in human PAECs (hPAECs) and human PASMCs (hPASMCs). (*A*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in hPASMCs from control subjects and patients with iPAH. (*B*) Quantification of SUR1 and Kir6.2 expression in hPASMCs from control subjects and patients with iPAH ($n=5$). (*C*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in hPAECs from control subjects and patients with iPAH. (*D*) Quantification of SUR1 and Kir6.2expression in hPAECs from control subjects and patients with iPAH ($n=4$–6). (*E*) Analysis by BrdU assay of the proliferation rate of hPAECs and hPASMCs from control patients treated with diazoxide (100 µmol/L) or DMSO ($n=6$–7 patients). (*F*) Analysis by BrdU assay of the proliferation rate of hPAECS and hPASMCs from patients with iPAH treated with diazoxide (100 µmol/L) or DMSO ($n=6$–7 patients). (*G*) Human PA control precontracted with U46619 (1 µmol/L) and diazoxide (100 µmol/L) versus the same volume of DMSO produced PA relaxation in control. Corresponding graph showing the percentage relaxation 10 minutes after diazoxide application ($n=5$ control subjects). *$P<0.05$ and ****$P<0.0001$. Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups.

Proof Only

Proof Only

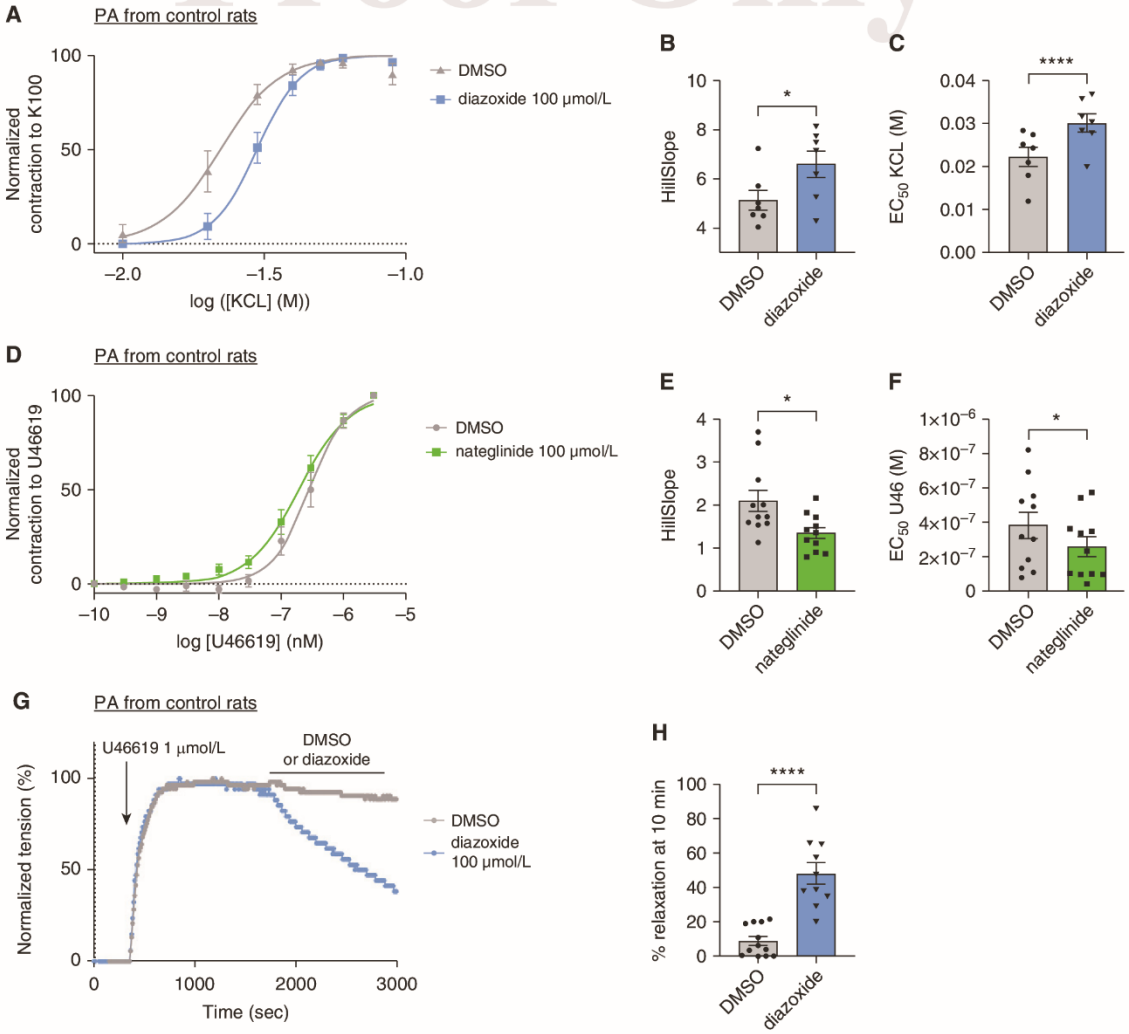


Figure 3. Contribution of the SUR1/Kir6.2 channel to the regulation of pulmonary arterial tone in control rats and human control subjects. (*A*) Dose–response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of KCl to isolated PA from control rats in the presence of DMSO or diazoxide (SUR1 activator, at 100 μmol/L). Corresponding quantification of (*B*) Hillslope and (*C*) EC50 values ($n = 7$ rats). (*D*) Dose–response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic) to isolated PA from control rats in the presence of DMSO or nateglinide (Kir6.2 channel inhibitor, at 100 μmol/L). Corresponding quantification of (*E*) Hillslope and (*F*) EC50 values ($n = 11$ rats). (*G*) Relaxant response to 100 μmol/L diazoxide in PA from control rats precontracted with U46619 (1 μmol/L). (*H*) Corresponding graph showing the percent relaxation to DMSO or diazoxide at 100 μmol/L ($n = 10$–12 rats). *$P < 0.05$ and ****$P < 0.0001$. Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups.

14

SUR1/Kir6.2 is efficient for PA relaxation in MCT-PH rats.

Next, we evaluated the consequence of SUR1 activation on PA relaxation in patients with iPAH (Figure 4J). We found that diazoxide induced the same relaxation of control PA as in iPAH-PA. These results suggest that SUR1/Kir6.2 contributes to the regulation of PA tone in patients with iPAH. Using supplemental myograph experiments that confirmed PA vasoconstriction in patients with iPAH, we found that the contractile dose–response to KCl was strongly shifted to the left in PA from patients with iPAH compared with PA isolated from control subjects (Figure E4B).

Expression of SUR1/Kir6.2 in the Heart from MCT-induced PH Rats and Patients with PAH

Because SUR1 and Kir6.2 are expressed in the heart, we performed qRT-PCR and Western blot experiments to measure the expression of *ABCC8/SUR1* and *KCNJ11/Kir6.2* in hearts from MCT-PH rats. The

Proof Only

Proof Only

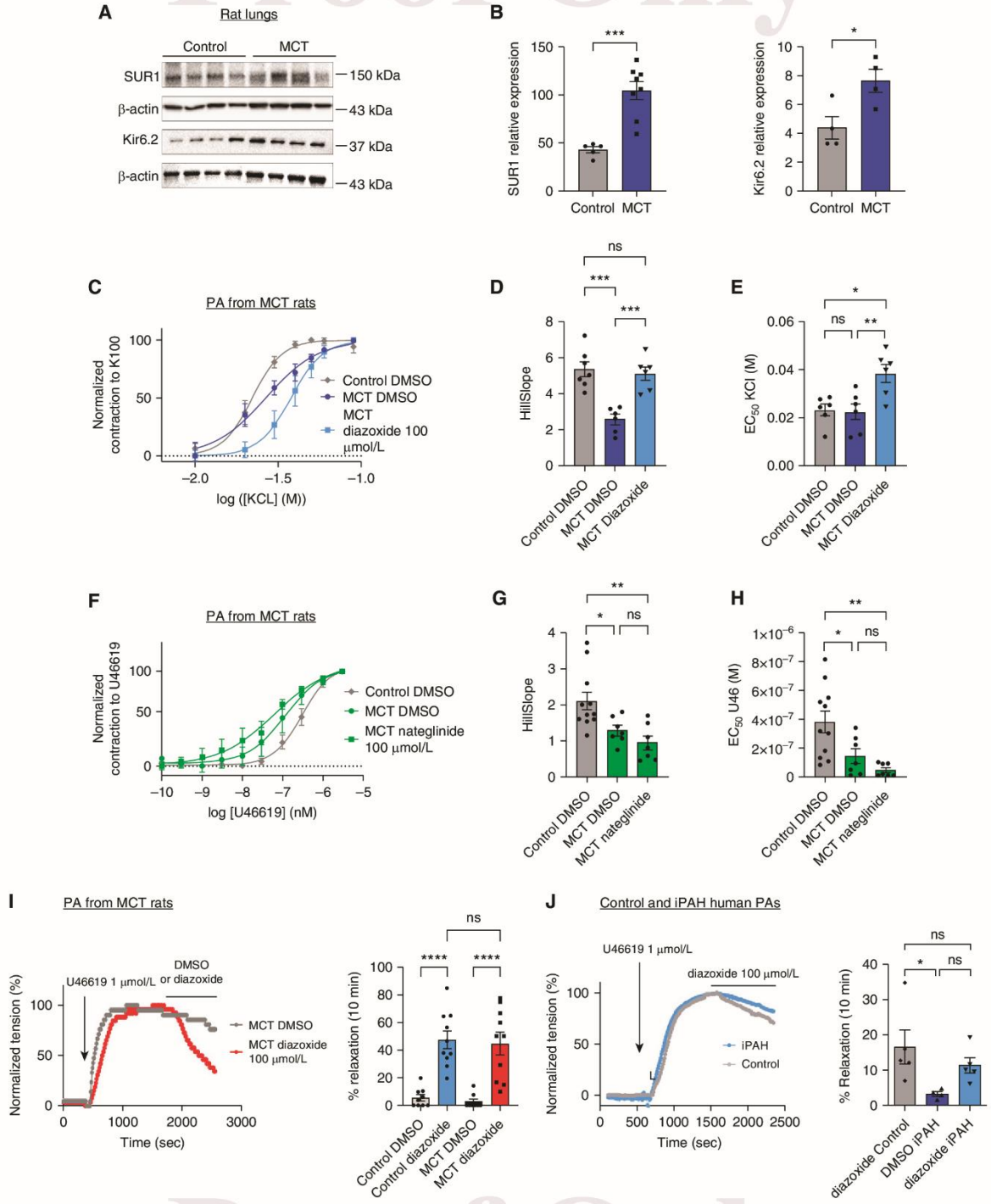


Figure 4. Contribution of the SUR1/Kir6.2 channel to the regulation of pulmonary PA tone in monocrotaline-pulmonary hypertension (MCT-PH) rats and human patients with iPAH. (*A*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in lungs from control and MCT-exposed rats (3 wk).

Proof Only

Proof Only

expression of SUR1 and Kir6.2 was decreased at the mRNA and protein levels in RV tissues from MCT-PH rats compared with control RV tissues (Figures E5A and E5B). In the left ventricle (LV), we found that *Abcc8* and *Kcnj11* mRNA were unchanged from MCT-PH rats compared with control rats (Figure E5C), whereas SUR1 and Kir6.2 protein levels were decreased in LV from MCT-PH rats compared with control LV (Figure E5D). From qRT-PCR, we found a similar expression of *KCNJ11* in the RV of patients with PAH, whereas we found a decrease in *ABCC8* in the RV of patients with PAH compared with control subjects (Figure E5E). In the LV, the KCNJ11 and ABCC8 mRNA concentrations were not significantly different between patients with PAH and control subjects (Figure E5F). However, these results do not rule out a possible regulation of functional SUR1 and Kir6.2 proteins.

In Vivo Diazoxide Treatment Interferes with the Development of PH Induced by MCT and by Chronic Hypoxia Exposure

The present study found that SUR1 was still expressed in the lungs and PA from patients with iPAH and MCT-PH rats. Therefore, we next evaluated the consequences of *in vivo* pharmacological activation of the SUR1 channel in MCT-PH rats (Figure 5). We administered diazoxide 20 mg/kg/d *in vivo* from Days 1 to 21 to MCT-PH rats (Figure 5A). We found an improvement in the RV systolic pressure (RVSP) (Figure 5B), cardiac output (CO) (Figure 5C), PVR evaluated by calculating the RVSP/CO ratio (Figure 5D), and RV hypertrophy (evaluated by Fulton index values) (Figure 5E) compared with MCT-vehicle (DMSO) rats. Diazoxide treatment also reduced aberrant wall thickness of muscularized pulmonary vessels induced by MCT exposure in rats (Figure 5F). However, in MCT diazoxide rats, we found a reduction in pulmonary neomuscularization, as attested by the increased nonmuscularized vessels and decreased muscularized vessels in MCT diazoxide rats versus MCT DMSO rats (Figure 5G). The LV stroke volume, systemic blood pressure measured in the carotid artery, and heart rate (HR) were unchanged between experimental groups (Figures E6A–E6C).

Moreover, when administered *in vivo* from Days 14 to 21 to MCT-PH rats (Figure 5H), diazoxide significantly improved CO (Figure 5I) and the RVSP/CO ratio (Figure 5J) but not the RVSP (Figure 5K) or Fulton index (Figure 5L) or pulmonary vessel wall thickness (Figure 5M). Importantly, we found a reduction of pulmonary neomuscularization in MCT diazoxide rats versus MCT DMSO rats (Figure 5N).

The LV stroke volume, systemic blood pressure measured in the carotid artery, and HR were unchanged between MCT DMSO and MCT diazoxide groups (Figures E6D–E6F).

Together, these results demonstrate that diazoxide treatment reduces the development of PH in MCT-exposed rats.

Next, we measured lung expression of SUR1 and Kir6.2 proteins in chronic hypoxia (CH)-exposed rats. Kir6.2 protein expression was unchanged in the lungs of CH-exposed rats compared with control rats, whereas SUR1 expression was decreased (Figure 5O). We evaluated the consequences of *in vivo* pharmacological activation of the SUR1 channel in CH-PH rats (Figure 5P). We administered 20 mg/kg/d of diazoxide *in vivo* from Days 14 to 21 to CH-PH rats, and we found only an improvement in the RVSP (Figure 5Q). The CO was similar in all three experimental groups (Figure 5R). The PVR and RV hypertrophy (evaluated by Fulton index values) were not significantly reduced (Figures 5S and 5T) compared with MCT-vehicle (DMSO) rats. At the pulmonary vascular level, short diazoxide treatment had no consequence on the aberrant pulmonary vessel wall thickness (Figures 5U) but reduced pulmonary vessel neomuscularization induced by CH in rats (Figure 5V).

The systemic blood pressure measured in the carotid artery and HR were unchanged between each CH DMSO and CH diazoxide group (Figures E7A and E7B). We obtained similar results when diazoxide was administered *in vivo* from Days 1 to 21 to CH-PH rats with an improvement of RVSP and pulmonary vessel wall thickness as well as a reduction of pulmonary vessel neomuscularization (Figures E7C–E7K). Together, these results suggest that diazoxide treatment interferes with the development of PH in CH-exposed rats, mainly by regulating PA tone.

In addition, we measured lung expression of SUR1 and Kir6.2 proteins in Sugen/hypoxia (Su/Hx)-exposed rats. Kir6.2 and SUR1 protein expression were unchanged in the lungs of SU/Hx-exposed rats compared with control rats (Figure E8).

Because SUR1 was also found to coassemble with TRPM4, we analyzed the expression of TRPM4 protein in the lungs. As shown in Figure E9, lung expression of TRPM4 was unchanged in iPAH or hPAH compared with control subjects (Figure E9A) and in MCT-PH or CH-PH rats compared with control rats (Figures E9B and E9C).

In Vivo Diazoxide Treatment Is Safe at the Cardiovascular Level in Healthy Rats

In the literature, some reports have indicated that diazoxide treatment in young patients with hyperinsulinism induced significant increases in mean PA pressure (14). To test the safety of diazoxide treatment on control rats, we chronically exposed control rats to 20 mg/kg/d for 3 weeks (Figure 6A).

Figure 4. (*Continued*). (*B*) Quantification of SUR1 and Kir6.2 expression in lungs from control and MCT rats ($n = 5$–8). (*C*) Dose–response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of KCl to isolated PA from control and MCT-PH rats in the presence of diazoxide at 100 μmol/L. Corresponding quantification of (*D*) Hillslope and (*E*) EC50 values ($n = 6$ rats). (*F*) Dose–response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic) to PA isolated from control and MCT-PH rats in the presence of nateglinide (Kir6.2 channel inhibitor, at 100 μmol/L). Corresponding quantification of (*G*) Hillslope and (*H*) EC50 values ($n = 7$ rats). (*I*) Graph showing the percentage relaxation to diazoxide at 100 μmol/L in MCT-PH rats ($n = 8$–10 rats), and corresponding graph showing the percent relaxation to DMSO or diazoxide in control and MCT rats ($n = 10$–12 rats). (*J*) Human PA control and iPAH PA precontracted with U46619 (1 μmol/L), showing diazoxide (100 μmol/L) relaxation in control patients and patients with iPAH, and corresponding graph showing the percent relaxation 10 minutes after diazoxide application versus DMSO ($n = 5$ control subjects vs. 6 iPAH). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, and $^{****}P < 0.0001$. Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups. Differences among three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for *post hoc* analyses.

Proof Only

Proof Only

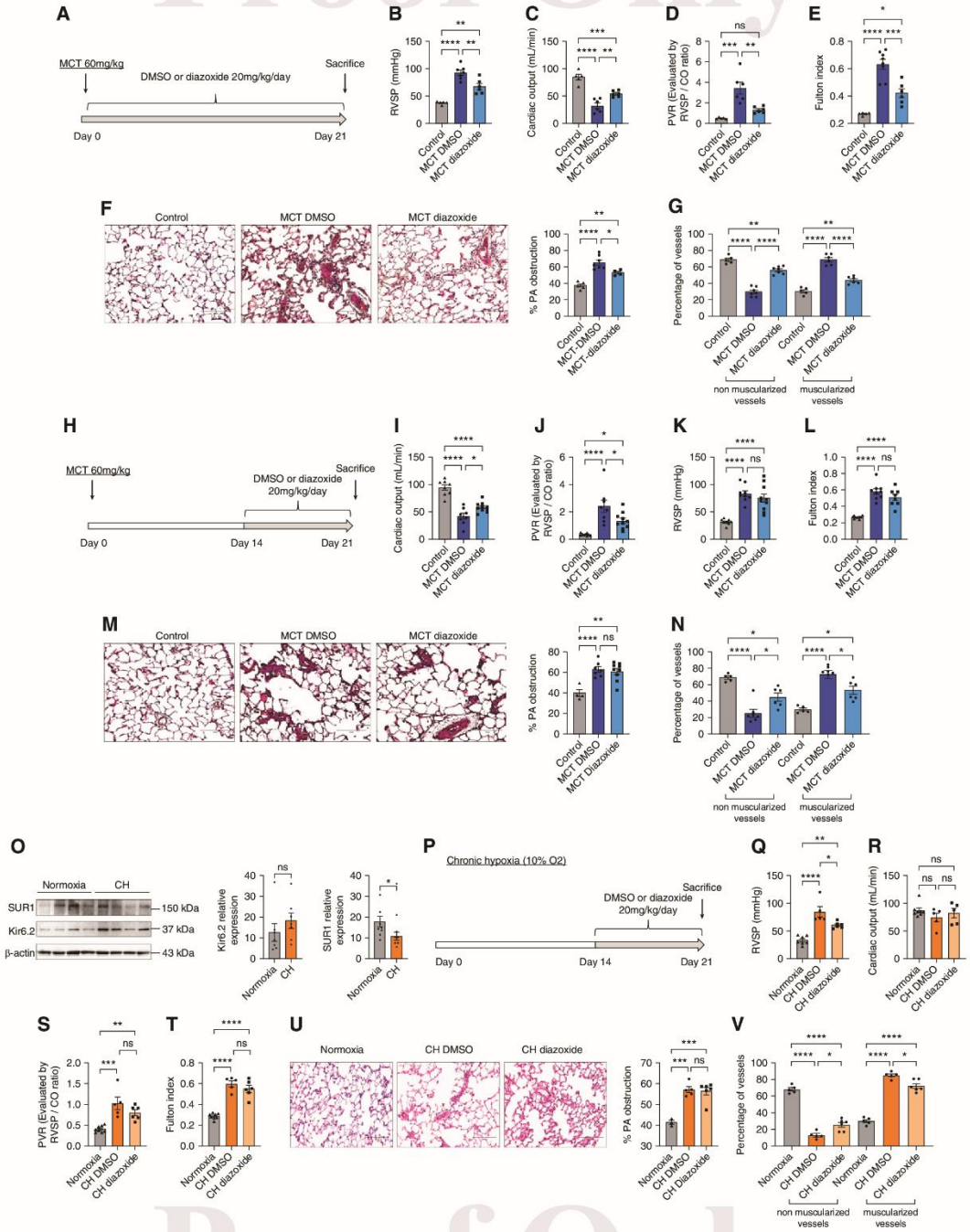


Figure 5. *In vivo* diazoxide treatment interferes with MCT-PH and chronic hypoxia (CH)-PH development. (*A*) *In vivo* experimental design. Diazoxide (20 mg/kg/d for 3 wk) was administered long term during MCT exposure by intraperitoneal injection. (*B*) Right ventricular systolic

Proof Only

Proof Only

We found that *in vivo* chronic activation of SUR1 had no pulmonary vascular consequence, as indicated by similar RVSP, CO, PVR, Fulton index, and pulmonary vascular cell proliferation (5-ethynyl-2′-deoxyuridine–incorporated cells) (Figures 6B–6F). Pulmonary vessel muscularization was not statistically different; however, the percentage of muscularized vessels tended to be higher in the diazoxide-treated group, suggesting that diazoxide treatment could favor pulmonary vessel neomuscularization (Figures 6G–6I). With echocardiography, we did not observe any difference in right and left heart functions (Table 1). LV thickness was reduced in diazoxide-treated animals without any consequence to LV fractional shortening and LV stroke volume. These results indicate that right and left heart function were unaffected by *in vivo* SUR1 activation by chronic exposure to diazoxide (Table 1). The systemic blood pressure measured in the carotid artery and HR were similar in DMSO- and diazoxide-exposed rats (Figure 6J and Table 1). After 2 weeks of diazoxide exposure, our data suggest the relative safety of SUR1 activation by diazoxide in the pulmonary vasculature and heart in healthy rats. However, the fact that we found insignificant increases in pulmonary vessel neomuscularization and a reduced LV thickness in diazoxide-treated rats highlights the need to monitor diazoxide side effects carefully.

Additional SUR1 Activators (VU0071063 or NN414) Produce Important PA Relaxation and Reduce the Development of PH Induced by MCT Exposure

It was demonstrated that diazoxide has several additional effects besides acting as a SUR1/Kir6.2 channel opener, including activation of SUR2, alteration of other ion channel and ATPase functions, and direct regulation of mitochondrial energetics (15–18). To avoid misinterpretation about the diazoxide effect on SUR1/Kir6.2, we performed an additional experiment with more selective activators of SUR1/Kir6.2 channel: VU0071063 and NN414. Because of their higher selectivity for SUR1/Kir6.2 channels, both molecules were recently proposed by Sikimic and colleagues as possible new strategies for treating congenital hyperinsulinism instead of diazoxide (19).

With the additional SUR1 activators, we measured the consequence of SUR1 activation on the relaxation of PA from control rats. After induction of contraction by 1 μmol/L U46619, we applied increasing concentrations (100 nmol/L to 100 μmol/L) of VU0071063, NN414, diazoxide, or DMSO. As shown in Figure 7A, the PA contraction is similarly reduced by increasing VU0071063 or NN414 or diazoxide concentration, indicating that SUR1 activators mediated PA relaxation as attested by the decrease in PA contraction (Figure 7B).

Importantly, in isolated aorta from control rat, we found a significant difference in aorta relaxation induced by SUR1 activators (diazoxide, VU0071063, or NN414) and the SUR2 activator (pinacidil). As presented in Figure 7C, we found that the SUR2 activator pinacidil produced aorta relaxation (median effective dose = 1.3 μmol/L) compared with SUR1 activators (55 μmol/L, 66 μmol/L, and 230 μmol/L for diazoxide, VU0071063, and NN414, respectively). These results indicated that SUR1 plays a crucial role in pulmonary arterial tone (by three different molecules) compared with its role in regulating aorta tone.

Finally, we evaluated the consequences of *in vivo* pharmacological activation of the SUR1 channel by NN414 in MCT-PH rats (Figure 7D). We administered 1.5 mg/kg/d NN414 twice daily to MCT-PH rats from Days 14 to 21. We found an improvement in the RVSP (Figure 7E), CO (Figure 7F), PVR (Figure 7G), and RV hypertrophy (Figure 7H). Similarly, with brief diazoxide treatment, the pulmonary vessel wall thickness remained unchanged in the MCT-NN414 group compared with the MCT-DMSO group (Figures 5M and 7I). In contrast, the pulmonary vessel neomuscularization was reduced by the NN414 treatment (Figure 7J). The systemic blood pressure measured in the carotid artery and HR was unchanged in each experimental group (Figures E10A and E10B).

Discussion

Using a combination of biochemical and *ex vivo* and *in vivo* approaches, we have provided five significant findings regarding the expression/function of SUR1/Kir6.2 in the context of PAH. First, SUR1 and Kir6.2 are expressed in hPASMCs and hPAECs. Second, SUR1/Kir6.2 expression and function (evaluated by myograph experiments) were not reduced in the lungs and PA of patients with PAH (iPAH or hPAH) or three experimental models of PH (MCT-PH, CH-PH, and Su/Hx). Third, the use of three different SUR1 activators (diazoxide, VU0071063, and NN414) showed that the SUR1/Kir6.2 channel modulates PA tone similarly in humans and rats in control subject and PH conditions. Fourth, pharmacological activation of SUR1

Figure 5. (*Continued*). pressure (RVSP) (mm Hg; $n = 5$–7 different rats per condition). (*C*) Cardiac output (CO) (ml/min; $n = 5$–6 different rats per condition). (*D*) Pulmonary vascular resistance (PVR) evaluated by the RVSP/CO ratio ($n = 5$–6 different rats per condition). (*E*) Fulton index (RV/left ventricle + septum; $n = 5$–8 different rats per condition). (*F*) Pulmonary vessel occlusion (%) analyzed by hematoxylin-eosin Safran (HES) staining ($n = 4$–7 rats per condition). (*G*) Percentage of nonmuscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat; $n = 4$–7 rats) as measured by immunostaining against α-smooth muscle actin (αSMA) and von Willebrand factor (VWF). (*H*) *In vivo* experimental design. Diazoxide (20 mg/kg/d for Day 14 to Day 21) was administered short term during MCT exposure by intraperitoneal injection. (*I*) RVSP (mm Hg; $n = 9$–11 rats per condition). (*J*) Cardiac output (ml/min; $n = 8$–10 rats per condition). (*K*) PVR, evaluated by calculating the RVSP/CO ratio ($n = 8$–11 rats per condition). (*L*) Fulton index ($n = 8$–9 rats per condition). (*M*) Pulmonary vessel occlusion (%) analyzed by HES ($n = 4$–9 rats per condition). (*N*) Percentage of nonmuscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat; $n = 5$–7 rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. (*O*) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in lungs from control and CH-exposed rats (3 wk). Quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in lungs from control and CH rats ($n = 4$–5). (*P*) *In vivo* experimental design. Diazoxide (20 mg/kg/d for Day 14 to Day 21) was administered short term during CH exposure by intraperitoneal injection. (*Q*) RVSP (mm Hg; $n = 5$–7 rats per condition). (*R*) CO (ml/min; $n = 5$–6 rats per condition). (*S*) PVR ($n = 5$–6 rats per condition). (*T*) Fulton index ($n = 5$–8 rats per condition). (*U*) Pulmonary vessel occlusion (%) analyzed by HES ($n = 3$–6 rats per condition). (*V*) Percentage of nonmuscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat; $n = 5$–7 rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, and $^{****}P < 0.0001$. Differences among three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for *post hoc* analyses.

Proof Only

Proof Only

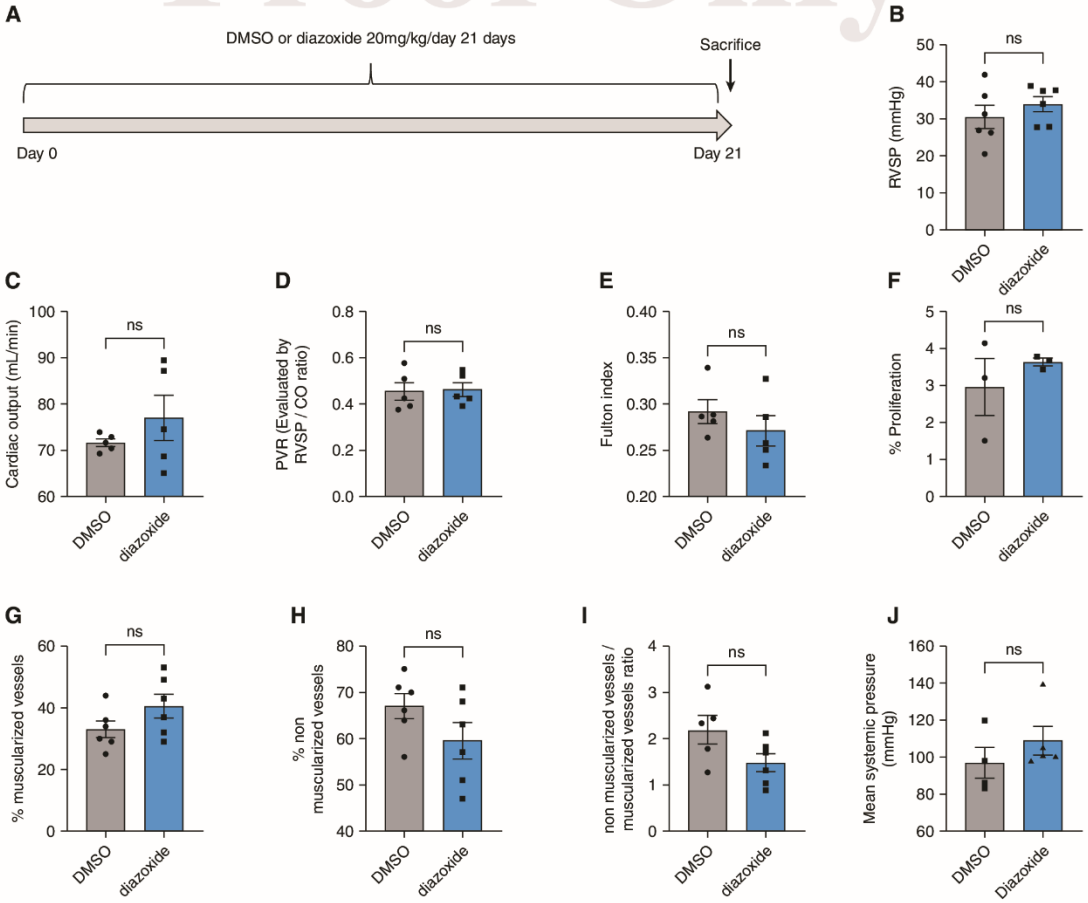


Figure 6. *In vivo* diazoxide treatment in healthy control rats. (*A*) *In vivo* experimental design. Diazoxide (20 mg/kg/d for 3 wk) was administered long term to healthy control rats by intraperitoneal injection. (*B*) RVSP (mm Hg; $n = 6$ rats per condition). (*C*) CO (ml/min; $n = 5$ rats per condition). (*D*) PVR ($n = 5$ rats per condition). (*E*) Fulton index ($n = 5$ rats per condition). (*F*) Quantification of the percentage of lung proliferating cells after immunofluorescent staining and confocal imaging of frozen rat lung sections labeled with Click-iT 5-ethynyl-2′-deoxyuridine ($n = 3$ rats). (*G* and *H*) Percentage of nonmuscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat; $n = 6$ rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. (*I*) Nonmuscularized/muscularized ratio vessels in DMSO- and diazoxide-exposed rats ($n = 6$ rats). (*J*) Mean systemic blood pressure measured in the carotid artery from DMSO- and diazoxide-exposed rats ($n = 6$ rats). Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups.

with diazoxide has no consequence on pulmonary circulation in healthy rats. Finally, *in vivo* pharmacological activation of SUR1 (by diazoxide and NN414) reduces the development of PH in the MCT-PH rat model.

Composition of KATP Channels in the Pulmonary Circulation

KATP channels are octameric complexes characterized by four pore-forming Kir channel (Kir6.1 or Kir6.2) subunits associated with four regulatory SUR1 or SUR2 subunits. SUR2B is ubiquitously expressed, whereas the alternatively spliced variant SUR2A is exclusively expressed in the heart (20). SUR1 expression is prominent in neuronal and pancreatic tissues and many other tissues, including cardiac, atria, and lung tissues (6, 21, 22). Previous work suggested that in systemic vascular smooth muscle and endothelial cells, KATP channels are predominantly constituted by SUR2 and not by SUR1. However, as Bohnen and colleagues (6) suggested, we show that PASMCs and PAECs express SUR1 and Kir6.2. We also found that pharmacological activation of SUR1 produces significant PA relaxation in control subjects and patients with PAH and PA from MCT-PH and control rats. In PASMCs, KATP channels, similar to other K^+ channels, contribute to the maintenance of membrane potential. In addition, KATP closure should lead to an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, enhancing PASMC contraction. In contrast, KATP opening increases K^+ efflux, leading to membrane hyperpolarization, inhibition of Ca^{2+} influx, and PASMC relaxation.

Proof Only

Proof Only

Table 1. Evaluation of Right Ventricle and Left Ventricle Function by Echocardiography Measured in Diazoxide- or DMSO-treated Rats

	DMSO ($n = 6$)	Diazoxide ($n = 6$)
HR, bpm	402.6 ± 16.59	397.5 ± 7.58
RVET, ms	76.67 ± 24	78.20 ± 1.62
PAAT, ms	32.51 ± 0.72	34.80 ± 0.97
VTI pulmonary artery, mm	6.98 ± 0.30	6.48 ± 0.39
RV EDd, mm	3.42 ± 0.37	4.28 ± 0.0.15
RV EDs, mm	1.85 ± 0.28	2.39 ± 0.29
RV thickness, mm	1.1 ± 0.06	1 ± 0.09
RV FS, %	45.50 ± 7.01	43.88 ± 7.23
VTI aorta, mm	6.76 ± 0.21	6.75 ± 0.64
Stroke volume aorta, ml	29.12 ± 1.57	31.63 ± 3.03
LV EDd, mm	7.14 ± 0.27	7.25 ± 0.19
LV EDs, mm	3.69 ± 0.36	4.03 ± 0.23
LV thickness, mm	1.34 ± 0.054	1.15 ± 0.06*
LV FS, %	48.13 ± 5.063	44.34 ± 3.24

Definition of abbreviations: EDd = end-diastolic diameter; EDs = end-systolic diameter; FS = fractional shortening; HR = heart rate; LV = left ventricle; PAAT = PA acceleration time; RV = right ventricle; RVET = RV ejection time; VTI = velocity-time integral.
Two-tailed unpaired Student's *t* tests assessed the difference between two groups.

KATP may be activated by NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor (23). Although KATP is understudied in PAECs, KATP channels are regulated by shear stress and are responsible for maintaining resting membrane potential in bovine PAECs (24). In this study, the use of a Kir6.2 inhibitor (nateglinide) demonstrated that Kir6.2 inhibition facilitates PA constriction, similar to the role of Kir6.1 described in systemic vascular tissues (25). These results indicate that the SUR1/Kir6.2 channel contributes to the regulation of PA tone and that *ABCC8* loss-of-function mutations should initiate PAH via an alteration of PA tone and a reduction in PA relaxation. Thus far, no abnormal cardiovascular phenotype has been reported in $sur1^{-/-}$ mice, whereas $kir6.1^{-/-}$ or $sur2^{-/-}$ mice developed hypertension and coronary vascular disorders (26, 27).

SUR1 subunits are mostly coassembled with Kir6.2; however, in the adult mouse hippocampus, endogenous SUR1 may interact with Kir6.1, suggesting that they form functional SUR1/Kir6.1KATP channels (28, 29). As for Kir6.2 expression, we found that Kir6.1 expression was unchanged in the lungs of patients with iPAH or experimental PH models. In addition, we found that both SUR1 and Kir6.2 are expressed in hPAECs and hPASMCs from control subjects and patients with iPAH. Interestingly, we found that pharmacological activation of SUR1 reduced the proliferation rate of hPAECs from control and iPAH, whereas SUR1 activation did not affect iPAH-PASMC proliferation. These results indicated that the role of SUR1 in pulmonary arteries is mainly related to the regulation of pulmonary arterial tone. Moreover, myograph experiments performed with or without endothelium suggest that the endothelial SUR1 function contributes to almost 20% of the PA relaxation mediated by diazoxide.

SUR1 was also reported to interact with and regulate TRPM4 channels (30). TRPM4 is known to be expressed in PASMCs (31), and we found that TRPM4 expression in the lungs of patients with iPAH and hPAH and several experimental models of PH was unchanged. However, we could reasonably propose that SUR1-TRPM4 assembly occurs in the pulmonary vasculature and that *ABCC8* loss-of-function mutations could also modify TRPM4 function in pulmonary vascular cells.

The Function of SUR1/Kir6.2 in the RV

SUR1 and Kir6.2 are expressed in the human heart (32). However, there is no strong evidence regarding the contribution of SUR1/Kir6.2 in the regulation of KATP in human ventricular myocytes. In mice, SUR1 is not an essential component of the ventricular KATP channel but is necessary for the atrial KATP channel. The recombinant SUR2A/Kir6.2 channels were shown to contribute to the ventricular KATP channel (33). Mice overexpressing SUR1 develop arrhythmias, including atrial fibrillation and sudden death (34), whereas hearts from $sur1^{-/-}$ mice have an improved functional recovery after ischemia (35). The Kir6.2 subunit contributes to the depression of cardiac excitability and contractility induced by the KATP channel opener (36). $Kir6.2^{-/-}$ mice have significant cardiac metabolic abnormalities, such as increased glycogen storage and decreased glycolysis (37). In mice, *kir6.2* deficiency reduces cardiac recovery after exercise and causes arrhythmias and sudden death after sympathetic overactivation (38). However, *kir6.2* lack does not alter cardiac function under basal aerobic conditions (36). Here we found that the mRNA concentration of *ABCC8* is reduced in RV tissues from patients with PAH and RV from MCT-PH rats. In contrast, *Kcnj11* is decreased only in the RV from MCT-PH rats, contributing to abnormal PH-RV cardiomyocyte excitability, contractility, and metabolism (39, 40). In LV tissues, we found unchanged mRNA expression (*Abcc8* and *Kcnj11*), whereas protein expression is reduced in LV from MCT rats. Therefore, we can hypothesize that transcriptional/translational mechanisms negatively regulate SUR1 and Kir6.2 protein concentrations. Because of the limited quantities of human cardiac tissues, unfortunately we cannot perform Western blot analysis on human hearts. Despite the existence of *sur1*- or *kir6.2*-deficient mice, no study has assessed the consequence of *sur1* or *kir6.2* deletion in pulmonary vascular or RV levels. Future studies are needed to investigate the pulmonary phenotype of $sur1^{-/-}$ or $kir6.2^{-/-}$ mice at baseline and after exposure to PH inducers.

Unchanged SUR1 Expression in PAH Pulmonary Circulation Contrary to Other Outward K^+ Channels: A Good Therapeutic Target?

Even though *ABCC8* loss-of-function mutations have been identified in some patients with PAH (6), we found unchanged expression of SUR1 and Kir6.2 in lungs from patients with PAH, which is unusual for K^+ channels in PAH. Indeed, most voltage-gated K^+ channels, including Kv1.1, Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.3, and Kv9.3, have decreased expression in PAH lungs (23). Moreover, 16 different loss-of-function mutations in *KCNK3* genes have also been identified in patients with PAH (23, 41), and we demonstrated that KCNK3 (or TASK-1) loss of expression/function is a hallmark of PAH and experimental PH (42). These different observations highlight the great difficulty of

Proof Only

Proof Only

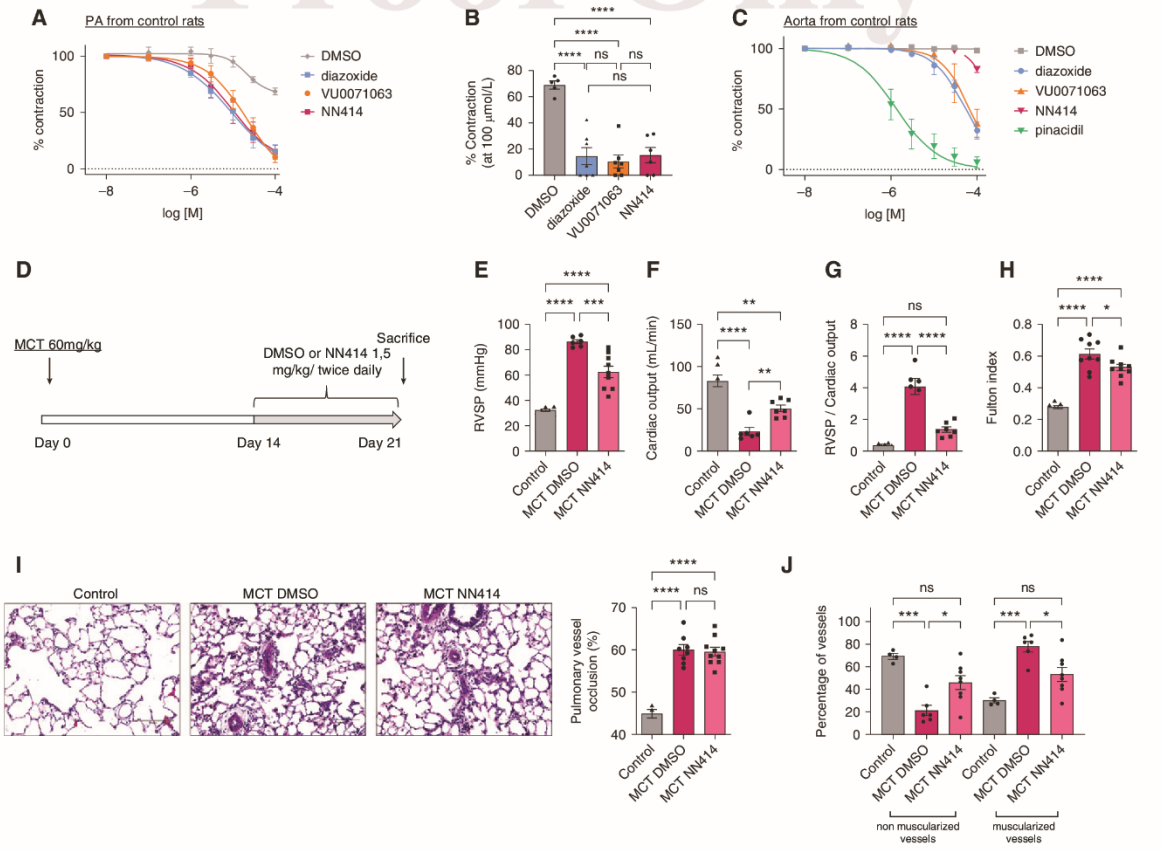


Figure 7. Additional SUR1 activators (VU0071063 or NN414) mediated PA relaxation, and pharmacological activation of SUR1 with NN414 reduced PH-induced MCT. (*A*) Dose–response to diazoxide (blue trace), NN414 (pink trace), VU0071063 (orange trace), and DMSO (gray trace) on precontracted control rat PA by 1 µmol/L of U46619. (*B*) Graphics representing the percentage of contraction at 100 µmol/L of PA treated with the different Sur1 activators or DMSO. (*C*) Dose–response to diazoxide (blue trace), NN414 (pink trace), VU0071063 (orange trace), pinacidil (green trace), and DMSO (gray trace) on precontracted control rat aorta by 1 µmol/L of U46619. (*D*) *In vivo* experimental design. NN414 (1.5 mg/kg/d twice daily for Day 14 to Day 21) was administered short term during MCT exposure by intraperitoneal injection. (*E*) RVSP (mm Hg; $n = 6$–9 rats per condition). (*F*) CO (ml/min; $n = 6$–7 rats per condition). (*G*) PVR ($n = 6$–7 rats per condition). (*H*) Fulton index ($n = 7$–10 rats per condition). (*I*) Pulmonary vessel occlusion (%) analyzed by HES ($n = 4$–10 rats per condition). (*J*) Percentage of nonmuscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat; $n = 5$–7 rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, and $^{****}P < 0.0001$. Differences among three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for *post hoc* analyses.

pharmacologically activating K^+ channels that are no longer expressed in PAH (Kv channels or KCNK3), which means that the activation of SUR1 is a great therapeutic opportunity for PAH, as we found that SUR1 is correctly expressed in PAH.

SUR1 Activation by Diazoxide

ABCC8 loss-of-function mutations cause congenital hyperinsulinism (43), and these patients are currently treated with diazoxide. In this study, we investigate the consequences of the pharmacological SUR1 activation by diazoxide. Diazoxide is the only U.S. Food and Drug Administration–approved drug to treat hyperinsulinemic hypoglycemia (44). Acute SUR1 activation by diazoxide application is described to strongly reduce PAPm in some patients with PAH (45, 46). Here, we show in human and experimental PH models that acute SUR1 activation produced substantial PA relaxation.

Moreover, we found that long-term *in vivo* SUR1 activation treatment reduced the development of PH with reduced RVSP, suggesting that SUR1 activation treatment mainly acts on the regulation of PA tone via an improvement in PA relaxation. Surprisingly, we found no significant modification of systemic blood pressures in animals treated with the SUR1 activators (diazoxide or NN414), whereas SUR1 activation reduced RVSP in MCT-PH rats mainly by inducing pulmonary arterial relaxation, although its role in the regulation of aorta tone is smaller. Because we found that aorta tone is more sensitive to SUR2 activation than SUR1 activation, our results

Proof Only

Proof Only

indicate that SUR2 highly contributes to the regulation of aorta tone, whereas SUR1 plays a key role in the regulation of PA tone; this probably explains why SUR1 activation did not affect systemic blood pressure.

Limitations of the Use of Diazoxide

Until diazoxide is proven to be safe in PAH, diazoxide is not recommended as a treatment for PAH. Several reports have indicated that hypoglycemic infants develop PH secondary to diazoxide treatment (14, 47), and the discontinuation of diazoxide treatment leads to the resolution of PH. The fact that diazoxide was found to induce PH in hyperglycemic infants remains a limitation of the use of diazoxide in PAH. Recently, Ohnishi and colleagues suggested a dose threshold for PH caused by diazoxide treatment and that diazoxide toxicity is influenced mainly by the dose rather than the duration of administration. Their study indicated that PH induced by diazoxide would possibly develop at doses higher than 10.4 mg/kg/d (48). Based on the analysis, lower doses of diazoxide, less than 10.4 mg/kg/d, should be used in hyperglycemic infants. The mechanisms underlying diazoxide-induced PH are unknown, and additional studies are needed to explain why diazoxide administration induces PH in a small portion of hyperglycemic infants (with around 7% incidence) (14, 47). Adebiyi and colleagues suggested that diazoxide-induced mitochondrial depolarization independent of SUR1 could have side effects (49).

In contrast, several studies suggested a cardioprotective effect of diazoxide, via an action on the mitochondrial respiratory chain (50). However, in the present study, we demonstrated diazoxide-induced PA relaxation in PA from patients with PAH who did not respond to acute NO administration. Our *in vivo* results indicate that chronic SUR1 activation improved PH symptoms, suggesting that this strategy might be helpful for patients with PAH. The fact that we found that diazoxide treatment in control rats favors pulmonary vessel neomuscularization could partly explain the deleterious effect of diazoxide. Diazoxide-induced PH is mimicked by people with Cantu syndrome, who have SUR2 gain-of-function mutations (51). Currently, our study does not support recommending the administration of diazoxide to patients with PAH. Of note, SUR1 and SUR2 proteins are both expressed in the pulmonary vascular cells. Because diazoxide was found to activate the reconstituted SUR2/Kir6.1 (52), we cannot exclude that a part of diazoxide effects could be because of SUR2 channel activation. Because of the reported diazoxide side effects, we used two additional SUR1 activators: VU0071063 and NN414. Because of their superior selectivity for SUR1/Kir6.2 channels, both molecules were recently proposed as possible new strategies for treating congenital hyperinsulinism by targeting SUR1 (19). VU0071063 is selective for SUR1/Kir6.2 and not for SUR2A/Kir6.2 and SUR2A/Kir6.1 channels, and VU0071063 opens SUR1/Kir6.2 channels with greater potency than diazoxide (53). NN414 is a 100-fold more potent selective agonist than diazoxide SUR1/Kir6.2 channels (54). *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated the potential of NN414 in the treatment of disorders resulting from excessive insulin release (55–57). However, VU0071063 seems to act directly on mitochondria, independently of SUR1. Thus, we focused on NN414 *in vivo*. However, we found that VU0071063 and NN414 produced similar PA relaxation to diazoxide and that NN414 treatment reduces MCT-PH phenotypes.

The SUR1/Kir6.2 and SUR2/Kir6.2 channels display differences in sulfonylurea sensitivity to diazoxide (58). Thus, further additional studies are needed to decipher the contribution of SUR2/Kir6.1 channels in PAH pathobiology. Moreover, we found that SUR1/Kir6.2 is expressed in RV and LV, and because diazoxide treatment may potentially induce cardioprotection (18), we cannot exclude that a part of diazoxide effects could be owing to diazoxide-mediated cardioprotection. Our results suggest that pharmacological activation of SUR1 could be of value in PAH and suggest that NN414 molecules should be further assessed as a PAH treatment.

Conclusions

We show evidence that the SUR1/Kir6.2 channel contributes to PA tone in humans and rats. SUR1/Kir6.2 channel expression and contribution to PA tone are maintained in PA from iPAH and experimental PH. Moreover, we show that *in vivo* SUR1 activation by two different activators (diazoxide and NN414) is effective at restoring/ameliorating PH in two experimental PH models. Despite the limitations of diazoxide and reported side effects in infants with hyperglycemia, the present results provide proof-of-concept that pharmacological activation of SUR1 should be considered in PAH. Using a more potent SUR1 activator (NN414), we confirmed that SUR1 could be considered as a pharmacologic target in PAH. Further evaluation of NN414 is needed to assess safety and efficacy in PAH. ■

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

Acknowledgment: The authors thank Yvonne Dutheil from INSERM U999, Hôpital Marie Lannelongue, for all her help. They also thank the "Plateforme de Pathologie Expérimentale et TRAnslationnelle au sein de AMMICa Inserm US23/UMS CNRS 3655 of Gustave Roussy hospital" for SUR1 and Kir6.2 immunostaining.

References

1. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, *et al.* Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2019;53:1801913.
2. Lau EMT, Giannoulatou E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2017;14: 603–614.
3. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, *et al.* Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J* 2019;53:1801887.
4. Eyries M, Montani D, Girerd B, Favrolt N, Riou M, Faivre L, *et al.* Familial pulmonary arterial hypertension by *KDR* heterozygous loss of function. *Eur Respir J* 2020;55:1902165.
5. Southgate L, Machado RD, Gräf S, Morrell NW. Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2020;17:85–95.
6. Bohnen MS, Ma L, Zhu N, Qi H, McClenaghan C, Gonzaga-Jauregui C, *et al.* Loss-of-function ABCC8 mutations in pulmonary arterial hypertension. *Circ Genom Precis Med* 2018;11: e002087.
7. Noma A. ATP-regulated K+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983;305: 147–148.

Proof Only

Proof Only

8. Flagg TP, Enkvetchakul D, Koster JC, Nichols CG. Muscle KATP channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. *Physiol Rev* 2010;90:799–829.
9. Wheeler A, Wang C, Yang K, Fang K, Davis K, Styer AM, *et al.* Coassembly of different sulfonylurea receptor subtypes extends the phenotypic diversity of ATP-sensitive potassium (KATP) channels. *Mol Pharmacol* 2008;74:1333–1344.
10. Kurland DB, Gerzanich V, Karimy JK, Woo SK, Vennekens R, Freichel M, *et al.* The Sur1-Trpm4 channel regulates NOS2 transcription in TLR4-activated microglia. *J Neuroinflammation* 2016;13:130.
11. De Franco E, Saint-Martin C, Brusgaard K, Knight Johnson AE, Aguilar-Bryan L, Bowman P, *et al.* Update of variants identified in the pancreatic β-cell K_{ATP} channel genes KCNJ11 and ABCC8 in individuals with congenital hyperinsulinism and diabetes. *Hum Mutat* 2020;41:884–905.
12. Ashcroft FM, Rorsman P. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:660–669.
13. Chachin M, Yamada M, Fujita A, Matsuoka T, Matsushita K, Kurachi Y. Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic beta-cell-type K(ATP) channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1025–1032.
14. Chen SC, Dastamani A, Pintus D, Yau D, Aftab S, Bath L, *et al.* Diazoxide-induced pulmonary hypertension in hyperinsulinaemic hypoglycaemia: recommendations from a multicentre study in the United Kingdom. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2019;91:770–775.
15. Kharade SV, Sanchez-Andres JV, Fulton MG, Shelton EL, Blobaum AL, Engers DW, *et al.* Structure-activity relationships, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the Kir6.2/SUR1-specific channel opener VU0071063. *J Pharmacol Exp Ther* 2019;370:350–359.
16. Pan Z, Huang J, Cui W, Long C, Zhang Y, Wang H. Targeting hypertension with a new adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener iptakalim. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:215–228.
17. Rohr AS, Siegel SC, Katz RM, Rachelefsky GS, Spector SL, Lanier R. A comparison of inhaled albuterol and cromolyn in the prophylaxis of exercise-induced bronchospasm. *Ann Allergy* 1987;59:107–109.
18. Coetzee WA. Multiplicity of effectors of the cardioprotective agent, diazoxide. *Pharmacol Ther* 2013;140:167–175.
19. Sikimic J, Hoffmeister T, Gresch A, Kaiser J, Barthlen W, Wolke C, *et al.* Possible new strategies for the treatment of congenital hyperinsulinism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:545638.
20. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* 1996;45:1439–1445.
21. Ashcroft FM. From molecule to malady. *Nature* 2006;440:440–447.
22. McClenaghan C, Woo KV, Nichols CG. Pulmonary hypertension and ATP-sensitive potassium channels. *Hypertension* 2019;74:14–22.
23. Lambert M, Capuano V, Olschewski A, Sabourin J, Nagaraj C, Girerd B, *et al.* Ion channels in pulmonary hypertension: a therapeutic interest? *Int J Mol Sci* 2018;19:3162.
24. Chatterjee S, Al-Mehdi A-B, Levitan I, Stevens T, Fisher AB. Shear stress increases expression of a KATP channel in rat and bovine pulmonary vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285:C959–C967.
25. Aziz Q, Thomas AM, Gomes J, Ang R, Sones WR, Li Y, *et al.* The ATP-sensitive potassium channel subunit, Kir6.1, in vascular smooth muscle plays a major role in blood pressure control. *Hypertension* 2014;64: 523–529.
26. Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, *et al.* Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels. *J Clin Invest* 2002;110: 203–208.
27. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, *et al.* Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 2002;8:466–472.
28. Soundarapandian MM, Wu D, Zhong X, Petralia RS, Peng L, Tu W, *et al.* Expression of functional Kir6.1 channels regulates glutamate release at CA3 synapses in generation of epileptic form of seizures. *J Neurochem* 2007;103:1982–1988.
29. Zhao K, Wen R, Wang X, Pei L, Yang Y, Shang Y, *et al.* EPAC inhibition of SUR1 receptor increases glutamate release and seizure vulnerability. *J Neurosci* 2013;33:8861–8865.
30. Woo SK, Kwon MS, Ivanov A, Gerzanich V, Simard JM. The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel. *J Biol Chem* 2013;288:3655–3667.
31. Yang X-R, Lin M-J, McIntosh LS, Sham JSK. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L1267–L1276.
32. Huang Y, McClenaghan C, Harter TM, Hinman K, Halabi CM, Matkovich SJ, *et al.* Cardiovascular consequences of K_{ATP} overactivity in Cantu syndrome. *JCI Insight* 2018;3:e121153.
33. Flagg TP, Kurata HT, Masia R, Caputa G, Magnuson MA, Lefer DJ, *et al.* Differential structure of atrial and ventricular KATP: atrial KATP channels require SUR1. *Circ Res* 2008;103:1458–1465.
34. Flagg TP, Patton B, Masia R, Mansfield C, Lopatin AN, Yamada KA, *et al.* Arrhythmia susceptibility and premature death in transgenic mice overexpressing both SUR1 and Kir6.2[DeltaN30,K185Q] in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H836–H845.
35. Elrod JW, Harrell M, Flagg TP, Gundewar S, Magnuson MA, Nichols CG, *et al.* Role of sulfonylurea receptor type 1 subunits of ATP-sensitive potassium channels in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2008;117:1405–1413.
36. Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, *et al.* Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 2001;88:570–577.
37. Youssef N, Campbell S, Barr A, Gandhi M, Hunter B, Dolinsky V, *et al.* Hearts lacking plasma membrane K_{ATP} channels display changes in basal aerobic metabolic substrate preference and AMPK activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;313:H469–H478.
38. Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, *et al.* Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13278–13283.
39. Antigny F, Mercier O, Humbert M, Sabourin J. Excitation-contraction coupling and relaxation alteration in right ventricular remodelling caused by pulmonary arterial hypertension. *Arch Cardiovasc Dis* 2020; 113:70–84.
40. Lambert M, Boet A, Rucker-Martin C, Mendes-Ferreira P, Capuano V, Hatem S, *et al.* Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/ dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2018;114:880–893.
41. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, *et al.* A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:351–361.
42. Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, *et al.* Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2016;133:1371–1385.
43. Huopio H, Reimann F, Ashfield R, Komulainen J, Lenko HL, Rahier J, *et al.* Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. *J Clin Invest* 2000;106:897–906.
44. Black J. Diazoxide and the treatment of hypoglycemia: an historical review. *Ann N Y Acad Sci* 1968;150:194–203.
45. Chan NS, McLay J, Kenmure AC. Reversibility of primary pulmonary hypertension during six years of treatment with oral diazoxide. *Br Heart J* 1987;57:207–209.
46. Klinke WP, Gilbert JA. Diazoxide in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1980;302:91–92.
47. Kylat RI. Pulmonary hypertension occurring with diazoxide use in a preterm infant with hypoglycemia. *Drug Healthc Patient Saf* 2019; 11:7–10.
48. Ohnishi Y, Okada S, Yasudo H, Kimura S, Suzuki Y, Hasegawa S. Pulmonary hypertension following increased dosing of diazoxide in an infant. *Int Heart J* 2020;61:1084–1087.
49. Adebiyi A, McNally EM, Jaggar JH. Sulfonylurea receptor-dependent and -independent pathways mediate vasodilation induced by ATP-sensitive K+ channel openers. *Mol Pharmacol* 2008;74:736–743.
50. Ovide-Bordeaux S, Ventura-Clapier R, Veksler V. Do modulators of the mitochondrial K(ATP) channel change the function of mitochondria in situ? *J Biol Chem* 2000;275:37291–37295.
51. Grange DK, Roessler HI, McClenaghan C, Duran K, Shields K, Remedi MS, *et al.* Cantú syndrome: findings from 74 patients in the International Cantú Syndrome Registry. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2019;181:658–681.

Proof Only

Proof Only

52. Matsuoka T, Matsushita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, *et al.* C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K(+) channels. *Circ Res* 2000;87:873–880.
53. Raphemot R, Swale DR, Dadi PK, Jacobson DA, Cooper P, Wojtovich AP, *et al.* Direct activation of β-cell KATP channels with a novel xanthine derivative. *Mol Pharmacol* 2014;85:858–865.
54. Dabrowski M, Larsen T, Ashcroft FM, Bondo Hansen J, Wahl P. Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type K(ATP) channel by two novel diazoxide analogues. *Diabetologia* 2003;46: 1375–1382.
55. Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HCM, *et al.* 6-Chloro-3-alkylamino-4*H*-thieno[3,2-*e*]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic β-cells. *J Med Chem* 2002; 45:4171–4187.
56. Ritzel RA, Hansen JB, Veldhuis JD, Butler PC. Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:795–805.
57. Alemzadeh R, Fledelius C, Bodvarsdottir T, Sturis J. Attenuation of hyperinsulinemia by NN414, a SUR1/Kir6.2 selective K-adenosine triphosphate channel opener, improves glucose tolerance and lipid profile in obese Zucker rats. *Metabolism* 2004;53:441–447.
58. Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J. Pharmaco-topology of sulfonylurea receptors: separate domains of the regulatory subunits of K(ATP) channel isoforms are required for selective interaction with K(+) channel openers. *J Biol Chem* 2000;275:717–720.

Proof Only

SUR1 as a New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension

Online Data Supplement

Short title: SUR1/Kir6.2 in PH

Hélène Le Ribeuz[1,2], Bastien Masson[1,2], Véronique Capuano[1,2], Mary Dutheil[1,2,3], Hans Gooroochurn[3], Angèle Boët[1,2], Maria-Rosa Ghigna[1,2,3], Vincent De Montpreville[3], Barbara Girerd[1,2,4], Mélanie Lambert[1,2], Olaf Mercier[1,2,5], Wendy K. Chung[6], Marc Humbert[1,2,4], David Montani[1,2,4] and Fabrice Antigny[1,2]

[1]*Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, School of Medicine, France*

[2]*INSERM UMR_S 999 « Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies », Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph-Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France*

[3]*Department of Pathology, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France.*

[4]*Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Respiratory and Intensive Care Medicine, Pulmonary Hypertension National Referral Center, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.*

[5]*Department of Thoracic and Vascular Surgery and Heart-Lung Transplantation, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue Hospital, 92350 Le Plessis Robinson, France.*

[6]*Columbia University, New York, NY, USA*

Corresponding author: Fabrice Antigny, INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. Tel.: (33) 1 40 94 22 99, e-mail: fabrice.antigny@universite.paris-sacaly.fr

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

Materials and methods

Patients: Human lung specimens were obtained at lung transplantation in 7 patients with PAH and upon lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from 10 control subjects. PAH patients underwent genetic counselling and signed consent for genetic analysis. Moreover, these 7 patients were included in the GWAS analysis of Ma and collaborators(13). When no mutation was identified in the PAH patients, they were classified as iPAH. In the lung specimens from control subjects, PAs were isolated away from tumour areas. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in the control subjects to rule out PH.

The patients studied were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a programme approved by our institutional Ethics Committee, and had signed informed consent forms (Protocol N8CO-08- 003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on June 18, 2008). All human tissues were obtained with signed informed consent from transplant recipients or families of organ donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

Human PASMC and PAEC culture- Human lung specimens were obtained at the time of a lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from control subjects. PAs were excised at a distance from tumor areas. hPAECs and hPASMCs were cultured as previously described (14, 15) and were used for the study at passages 4-5. Patients studied were part of a program approved by the institutional Ethics Committee and had given written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006).

Pulmonary vascular cells proliferation measurement- To evaluate cell proliferation, we quantified BrdU incorporation in a cell undergoing DNA replication using a DELFIA cell proliferation kit (AD0200, PerkinElmer). Experiments were performed according to the kit recommendations. To evaluate the proliferation state of the cells, different treatments were used: hPASMCs and hPAECs from control and PAH subjects were treated 24 hours with diazoxide (100 µmol/L) or the same amount of DMSO. To stimulate the cell proliferation, the medium contained 10 percent of FBS + EGF + insulin

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

in the presence of 1 µmol/L BrdU for 24 h (Perkin Elmer). The fluorescence signal in the 96-well plate was read with an Envision 2103 plate reader (Perkin Elmer).

Animals and surgical procedures: The animal facility is licenced by the French Ministry of Agriculture (agreement N°C92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA26 CAP Sud [#23044]). The animal experiments were performed in compliance with the guidelines from Directive 2010/63/EU on 22 September 2010 of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's guidelines for animal care and handling.

In vivo experiments performed in the study were performed according to clinical trial standards: rats were randomly distributed between groups, and all methods and analyses were performed blinded to the conditions. All rats received a number known by only the experimenter who administered the treatment to rats. Before euthanasia (day 21), all rats underwent an evaluation with closed-chest right heart catheterization. This experiment was performed by a blinded experimenter who did not know the correspondence between ID and treatment. Haemodynamic parameters were analysed blind.

Male Wistar rats (5 weeks old) were used in four experimental protocols:

1. PH was induced by a single MCT injection (60 mg/kg, s.c.). MCT was dissolved in 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH. Control animals received the same volume of saline solution.

2. For the chronic hypoxia (CH) model, Wistar rats were placed for 3 weeks in hypoxia (10% O2) under normobaric conditions. Normal Wistar rats were placed in the same room for 3 weeks. CH-exposed Wistar rats were treated with diazoxide (20 mg/kg/day in DMSO, daily intraperitoneal injection) from days 14 to 21 in a short and late protocol and from days 0 to day 21 with a chronic protocol. Diazoxide was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

3. For the Sugen-hypoxia model, Wistar rats were injected with 20 mg/kg SU5416 and placed for 3 weeks in hypoxia (10% O2). After 3 weeks of hypoxia, the animals returned to normoxia for an additional 5 weeks. Sugen compound was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

4. MCT-exposed Wistar rats were treated with diazoxide (20 mg/kg/day in DMSO, daily intraperitoneal injection) from days 14 to 21 in a short and late protocol and from days 0 to day 21 with a chronic protocol. Diazoxide was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

5. MCT-exposed Wistar rats were treated with NN414 (1.5 mg/kg/ twice daily in DMSO, intraperitoneal injection) from days 14 to 21 in a short protocol. NN414 was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

Chemicals: MCT, diazoxide, VU0071063 (7-[[4-(1,1-Dimethylethyl)phenyl]methyl]-3,7-dihydro-1,3-dimethyl-1H-purine-2,6-dione), NN414 (6-Chloro-3-[[1-methylcyclopropyl]amino]-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, Tifenazoxide) and nateglinide were obtained from Sigma. U46619 and Sugen were obtained from R&D Systems.

Western blot analyses: Total protein from human or rat lungs or isolated PA tissue samples was prepared as described previously (14). The list of antibodies used is presented in Supplemental Table 1.

Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR): Total RNA was extracted using TRIzol according to standard protocols. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 205311). Gene expression was quantified using qPCR following the standard protocol for ready-to-use TaqMan gene expression assays (Life Technologies) on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies). Predesigned probe sets used for experiments are described in Supplemental Table 2.

Haemodynamic measurements and collection of tissues: Rats were placed under general anaesthesia and spontaneous breathing with an isoflurane Rodent Anaesthesia System (Minerve Esternay, France) (maintenance: isoflurane 2% at room air). Haemodynamic measurements, such as right ventricular systolic pressure (RVSP; mmHg), cardiac output (CO; ml/min), and mean carotid pressure (mCP; mmHg), were measured blindly in unventilated anaesthetized rats using a closed chest technique. After catheterization, tissues were collected, and Fulton's index, the ratio of RV weight to LV plus septal (S) weight (RV/LV+S), was calculated.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

Myograph experiments: Human PAs and rat PAs and or descending aorta were mounted in an emkaBATH4 modular tissue bath system (EMKA Technologies, Paris, France) coupled to IOX software (EMKA Technologies). As determined in preliminary experiments, human PAs were set at optimal length by equilibration against a passive load of 0.6 g, and rat PAs were set at 0.250 g and aorta at 1 g. For each condition using rat PAs, we used 7–10 PAs from 7–10 different animals in each condition. The PA internal diameter was between 150 and 250 µm.

Vessels were bathed in Krebs solution containing (in mmol/L) 119 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.17 $MgSO_4$, 1.18 KH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, and 11 glucose at 37°C and continuously aerated with a mixture of CO_2/O_2 (5%/95%). Rat PAs were set at optimal length by equilibration against a passive load of 0.3 g. After adding Krebs solution again, vessels were contracted with 100 mmol/L K^+-containing solution (K100). Once a plateau was reached, the vessels were washed with Krebs solution for 30 min. DMSO, diazoxide (100 µmol/L), or nateglinide (100 µmol/L) were used as pretreatments before the dose-response to KCl (10–90 mmol/L). Diazoxide, VU0071063, NN414 was also used to induce relaxation by increasing concentration (1nmol/L to 100µmol/L) after vessel contraction, obtained using the thromboxane A2 analogue U46619 (1 µmol/L). All modified Krebs solutions prepared with various KCl concentrations (K10 to K100) had an equimolar substitution of NaCl to maintain constant osmolarity and $[Cl^-]$ compared to standard Krebs solution. The contractile responses were expressed relative to the response to the K100 challenge. The relaxation responses were expressed as the percentage of the precontractile response obtained with U46619.

Echocardiographic measurement: Evaluation by trans-thoracic echocardiography (TTE) was performed with a digital ultrasound system (Vivid E9, GE Healthcare) using a high-frequency phased array transducer (12 S-D 4-12 MHz, GE Healthcare). The echocardiographic evaluation procedure was performed under general anaesthesia and spontaneous breathing with an Isoflurane Rodent Anaesthesia System (Minerve, Esternay, France) (maintenance isoflurane 2% at room air). Rats were shaved, and body temperature was controlled during experiments. All analyses were performed in a blinded manner: rats' experimental conditions were unknown by the operator during TTE examination and data interpretation. Measurement of pulmonary artery acceleration time (PAAT), heart rate (HR), and

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

pulmonary artery velocity time integral (VTI) were performed as previously described(16). In the 4-cavity view performed subcostally, we measured RV and LV thickness, RV or LV end-diastolic diameter (RV EDd, LV EDd, respectively), and systolic diameter (RV EDs, LV EDs). RV and LV fractional shortening (FS) correspond to the percent change in LV and RV cavity diameters, respectively. LV FS (%) = (LV EDd-LV EDs/LV EDd) * 100 or RV FS (%) = (RV EDd -RV EDs/RV EDd) * 100.

Immunofluorescence staining: Frozen lungs were prepared as described previously(14). Paraffin-embedded 5µm thick sections of lung samples were mounted on SuperFrostPlus slides (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). The immunostainings using rabbit polyclonal antibody SUR1 (1/60) and Kir6.2 (1/800) were performed according to the facility automated protocol (benchmark GX autostainer, Ventana Medical System, Roche).

Frozen lungs were cut at 5 µm and air-dried. Slices were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% for 10 minutes at room temperature. Free aldehyde groups from PFA fixation were quenched for 10 minutes with 50 mM NH4Cl solution. Slices were saturated with human serum (10%) in PBS for 1 hour at room temperature. We used primary antibodies against SUR1 (1/100) or Kir6.2 (1/100) against α-Smooth Muscle Actin (α-SMA, Sigma, F3777) (1/200). Primary Antibody was detected with the secondary antibodies goat anti-mouse and goat anti-rabbit (1/400). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

Vessel muscularization was evaluated by immunostaining against alpha-SMA-FITC (SMC marker F3777 Sigma)/Von Willebrand Factor (endothelial marker, A0082 DAKO). To assess cell proliferation in rats, we visualized the incorporation of exogenously supplied 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) to identify cells undergoing DNA replication. EdU was injected intraperitoneally into the rats at 50 µg/g 24 h before sacrifice. EdU staining was performed using a Click-iT EdU imaging kit (C10337, Life Technologies) on frozen lung sections according to the manufacturer's instructions.

Sections were viewed under a LSM 700 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). Images were recorded and analyzed with ZEN software (Carl Zeiss).

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

Pulmonary vessel remodelling analysis: The lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and serially sectioned (5 µm). The histopathological evaluation of the lungs was performed by a pulmonary pathologist who was blinded to the rats' genotypes and treatment group assignments. The morphometric analyses were performed on sections stained with hematein-eosin-Safran (HES). The lung samples from all the conditions were analysed by conventional light microscopy using quantitative semiautomated software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodelling was assessed in all the pulmonary vessels larger than 50 µm and less than 100 µm that were identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. The wall thickness was calculated according to the following equation: (External diameter -Internal diameter) / (External diameter)) × 100.

Statistical analyses: All statistical tests were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, version 8.0 for Windows). All data were verified for normal distribution using the Shapiro-Wilk normality test. All values are reported as the mean ± SEM. For all experiments, the difference between two groups was assessed by two-tailed unpaired Student's t-tests. The differences between three groups were evaluated with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses. Differences were considered statistically significant at p-values <0.05.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

Supplemental tables

Supplemental Table 1: Antibodies used for western blotting and Immonuhistochemistry

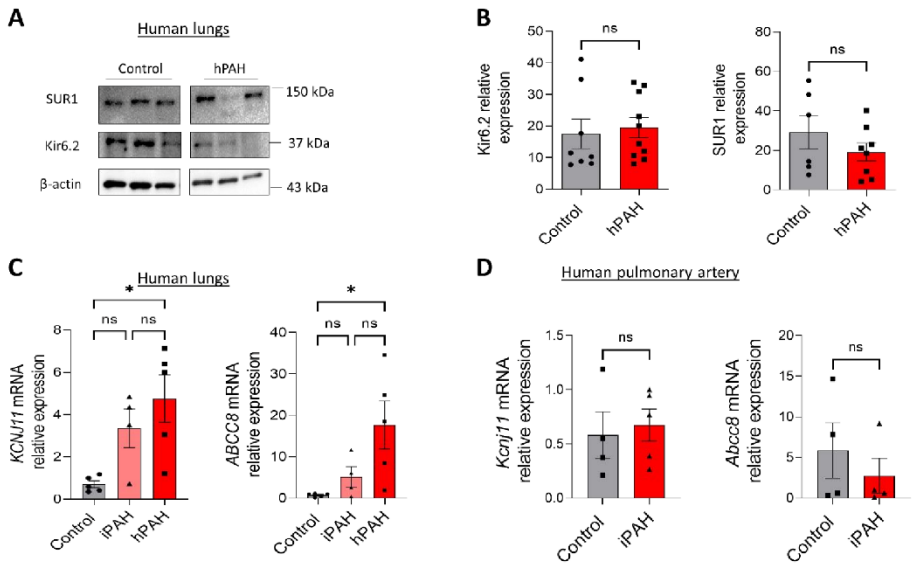
Antibody	Species	Dilution WB	Dilution IHC	Dilution IF	Suplier	Reference
KIR6.2	Mouse	x	1/800	x	Santa cruz	sc-390104
KIR6.2	Rabbit	1/1000	x	1/100	Alomone labs	APC-020
SUR1	Mouse	1/1000	1/50	1/100	Novus biologicals	S289-16
TRPM4	Rabbit	1/1000	x	x	Alomone labs	ACC-044
β-actin-HRP	Mouse	1/2000	x	x	Santa cruz	sc-47778
α-SMA-FITC	Mouse	x	x	1/200	sigma	A2547

Supplemental Table 2: Primers used for RT-qPCR

Gene	Primer reference (Applied Biosystem)	Species
18S	Hs03003631_g1	Human
ABCC8	Hs01093752_m1	Human
ABCC8	Rn01476317_m1	Rat
KCNJ11	Hs00265026_s1	Human
KCNJ11	Rn01764077_s1	Rat
ABCC9	Hs00245832_m1	Human
ABCC9	Rn00564842_m1	Rat
KCNJ8	Hs00958961_m1	Human
KCNJ8	Rn01492857_m1	Rat

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

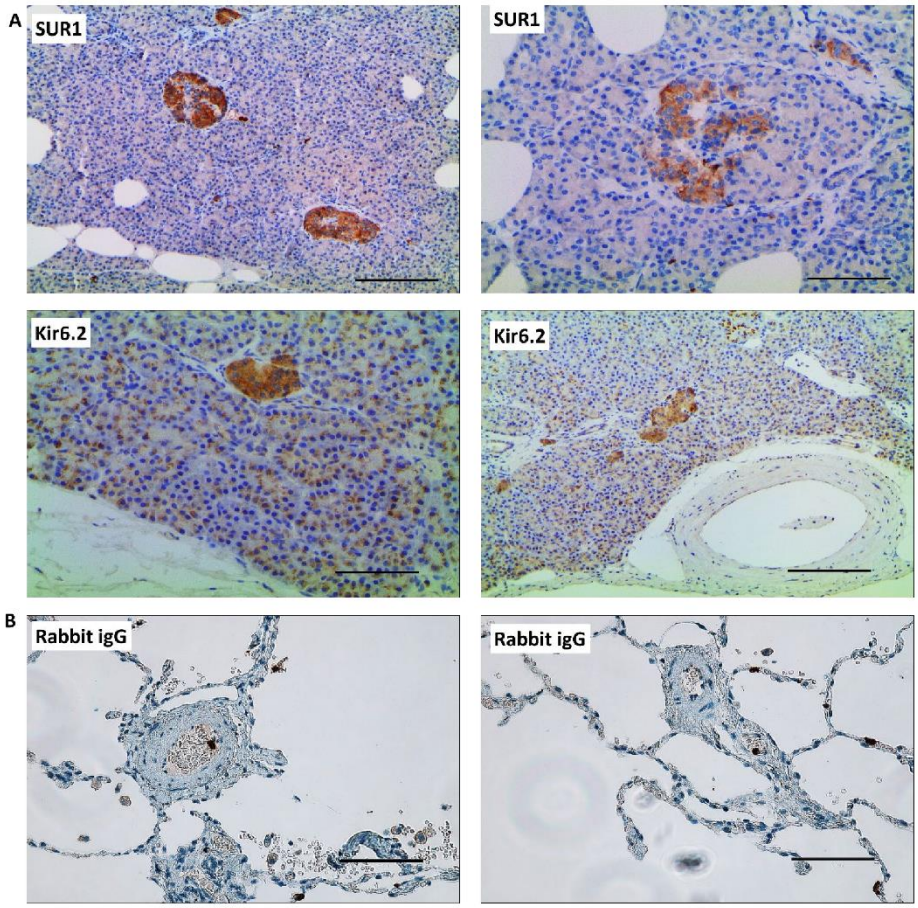
Supplemental figure legends



Supplemental figure 1

Supplemental Figure 1: Expression of SUR1 and Kir6.2 protein in lung from hPAH patients and analysis of mRNA level of ABCC8 and KCNJ11 in isolated PA from control and iPAH patients (A) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in lung from control and hPAH patients (*BMPR2* mutation carriers). (B) Quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in lungs from control and hPAH patients (*BMPR2* mutation carriers) (n=9-12). (C) mRNA level expression of *Kcnj11* (left panel) and *Abcc8* (right panel) on lungs from control and iPAH patients (n=4-5 patients). (D) mRNA level expression of *Kcnj11*(left panel) and *Abcc8* (right panel) on isolated PA from Control and iPAH patients (n=4-5 patients). ns: non-significant. *P<0.05. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between two groups. The difference between three groups was evaluated with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

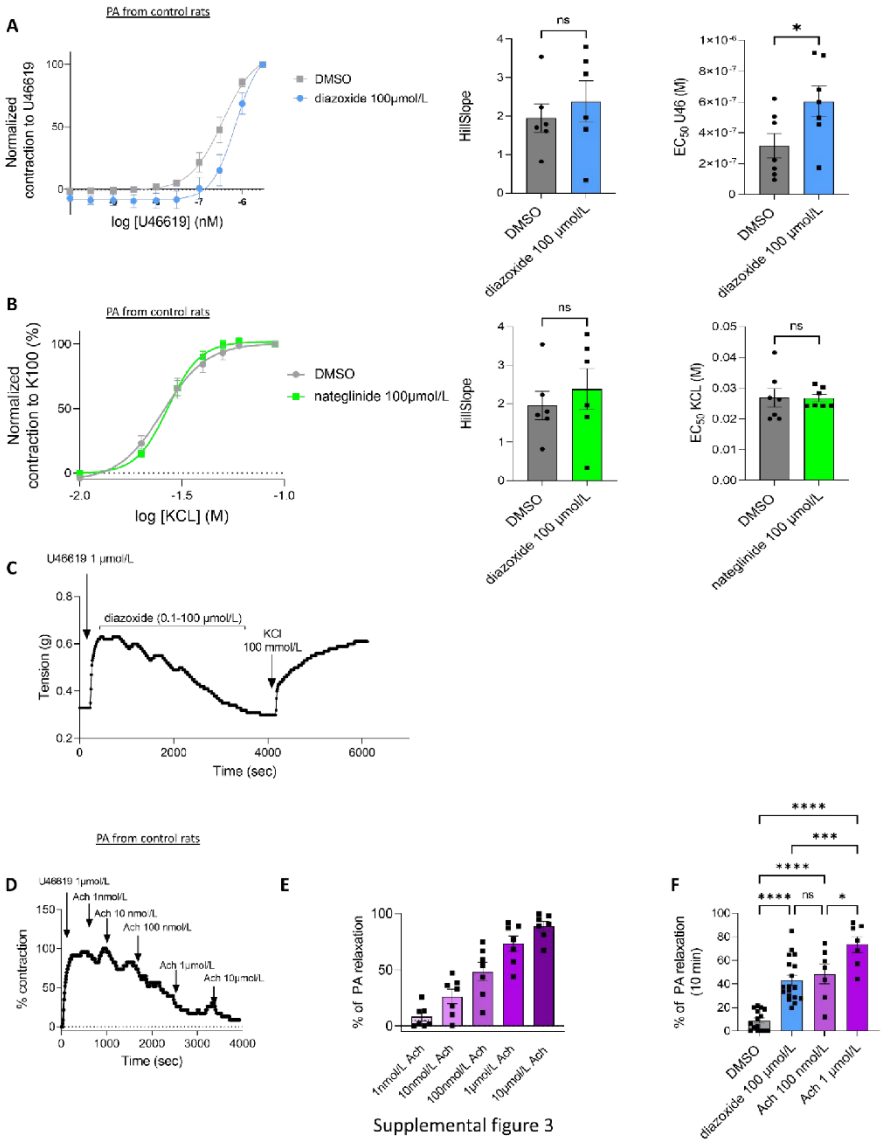
AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental figure 2

Supplemental Figure 2. Positive and negative controls for SUR1 and Kir6.2 immunostaining (A) SUR1 or Kir6.2 immunostaining in paraffin-embedded pancreas sections from control patients; immunostaining (B) In human lung sections, rabbit pre-immune serum incubation gave negative immunostaining. Scale Bar 100 μm.

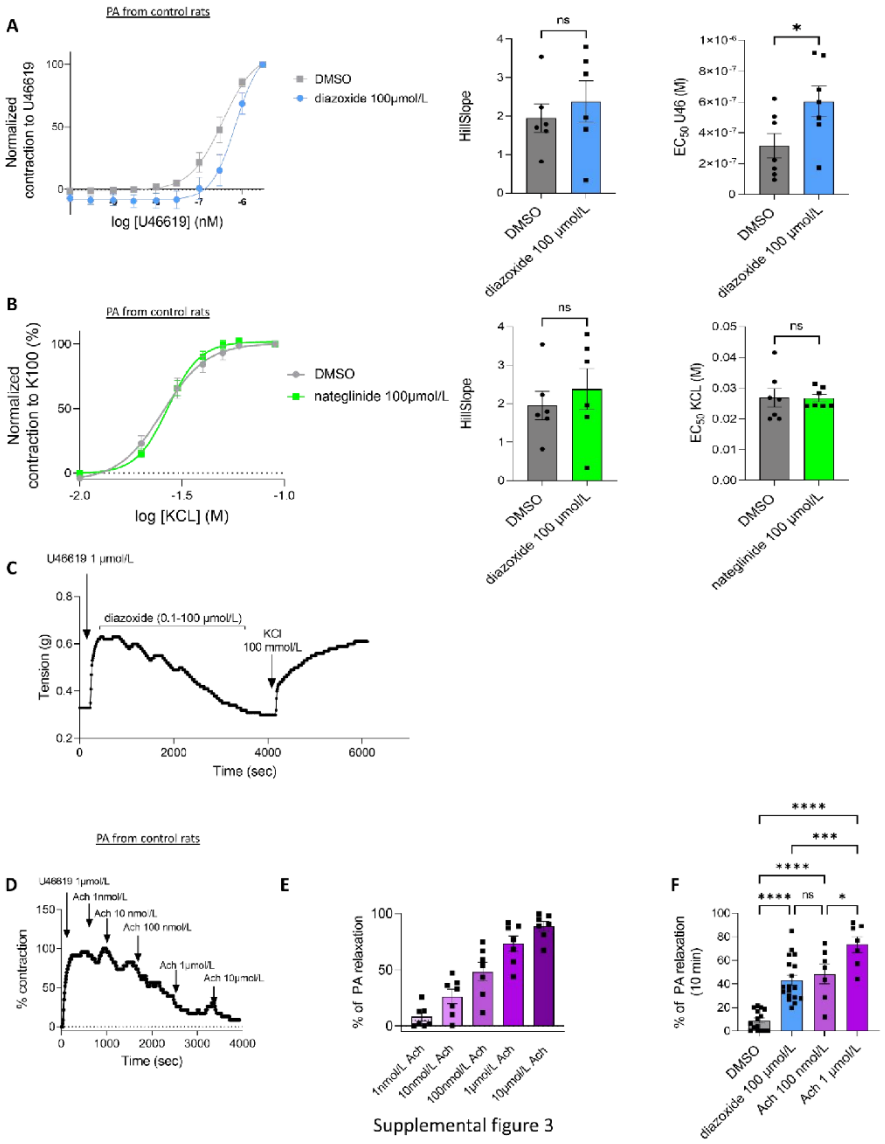
AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental figure 3

Supplemental Figure 3: Consequence of diazoxide or nateglinide application on pulmonary arterial tone. (A) Dose-response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic) to isolated PAs from control rats in the presence of DMSO or diazoxide (SUR1 activator, at 100 µmol/L). Corresponding quantification of Hillslope and EC50 values

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



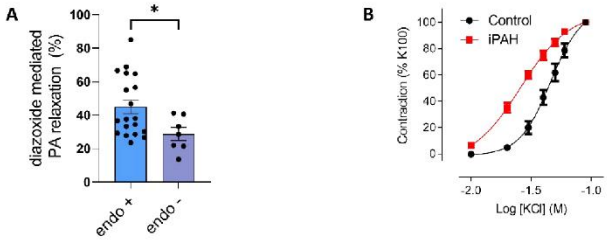
Supplemental figure 3

Supplemental Figure 3: Consequence of diazoxide or nateglinide application on pulmonary arterial tone. (A) Dose-response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of U46619 (thromboxane A2 mimetic) to isolated PAs from control rats in the presence of DMSO or diazoxide (SUR1 activator, at 100 µmol/L). Corresponding quantification of Hillslope and EC50 values

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

(n=6-7 rats). (B) Dose-response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of KCl to isolated PAs from control rats in the presence of DMSO or nateglinide (Kir6.2 inhibitor, at 100 µmol/L). Corresponding quantification of Hillslope and EC50 values (n=6-7 rats). (C) Evaluation of PA vitality by applying 100mM KCl. (D) After PA pre-contraction with 1µM of U46619, application of increasing dose concentrations of acetylcholine (Ach) on isolated PA from control rats. (E) Ach dose-response curve. (F) Corresponding quantification of % of relaxation induced by DMSO, Acetylcholine, and diazoxide (100µM) (n=7 rats). ns: non-significant. *P<0.05 ***p<0.001, ****p<0.0001. The difference between two groups was assessed by two-tailed unpaired Student's t-tests Difference between three groups was evaluated with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

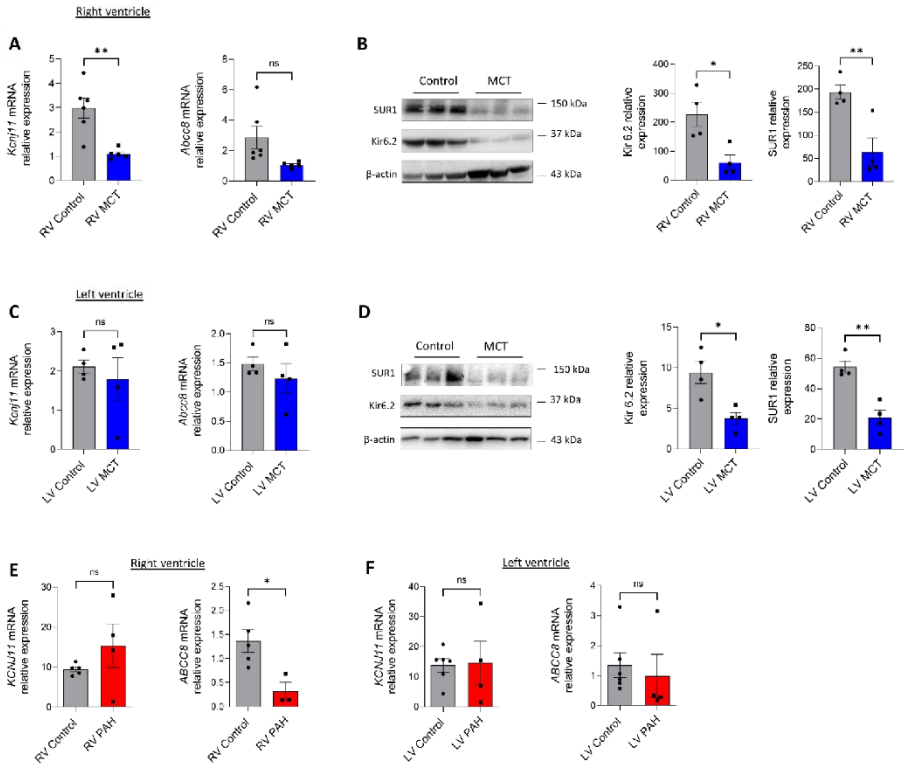
AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental figure 4

Supplemental Figure 4: Diazoxide mediated pulmonary artery relaxation in the absence of pulmonary endothelium, and pulmonary artery vasoconstriction in iPAH patients (A) Quantification of diazoxide mediated PA relaxation with (endo +) or without pulmonary endothelium (endo -) (n=7 rats). (B) Concentration-response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of K^+ on PA isolated from human control and iPAH PA rings (n = 9 patients for each condition). ns: non-significant. *P<0.05 Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between two groups.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



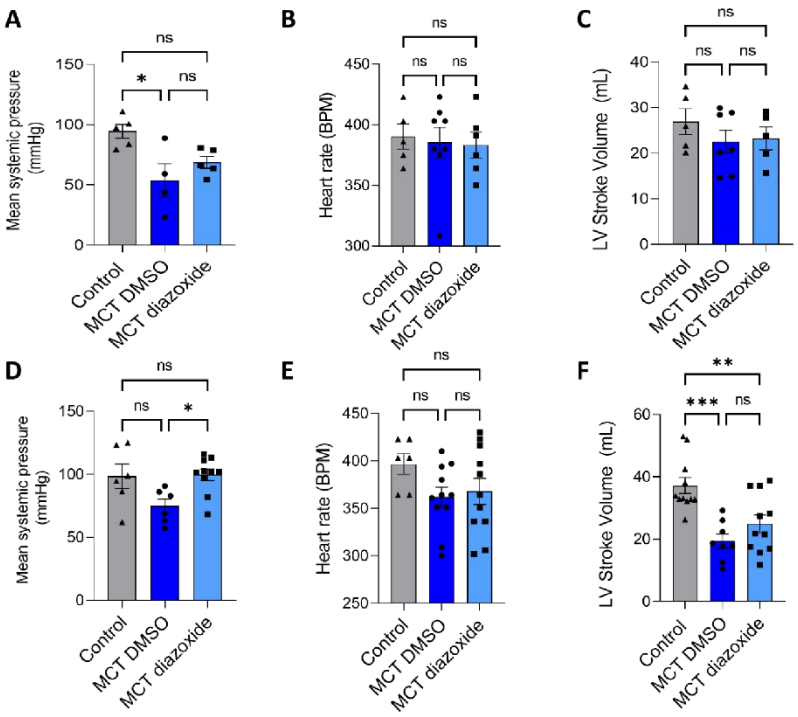
Supplemental Figure 5

Supplemental Figure 5: Expression of SUR1 and Kir6.2 protein in the right and left ventricles. (A) mRNA level expression of *Kcnj11* (A) and *Abcc8* on right ventricular (RV) from Control and monocrotaline (MCT)-PH rats (3 weeks) (n=6 rats). (B) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in RV from control and MCT-PH rats (3 weeks), and quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in RV from control and MCT- rats (n=5-8). (C) mRNA level expression of *Kcnj11* and *Abcc8* on left ventricular (LV) from Control and MCT-PH rats (3 weeks) (n=6 rats). (D) Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in LV from control and MCT-PH rats (3 weeks), and quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in LV from control and MCT- rats (n=5-8). (E) mRNA level expression of *ABCC8* and *KCNJ11* on RV from Control and iPAH patients (n=3-5 patients). (F) mRNA level expression of *ABCC8* and *KCNJ11* on LV from Control and iPAH patients (n=4-5 patients) non-

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

significant., *P< 0.05 **P<0.01 vs control. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between two groups.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



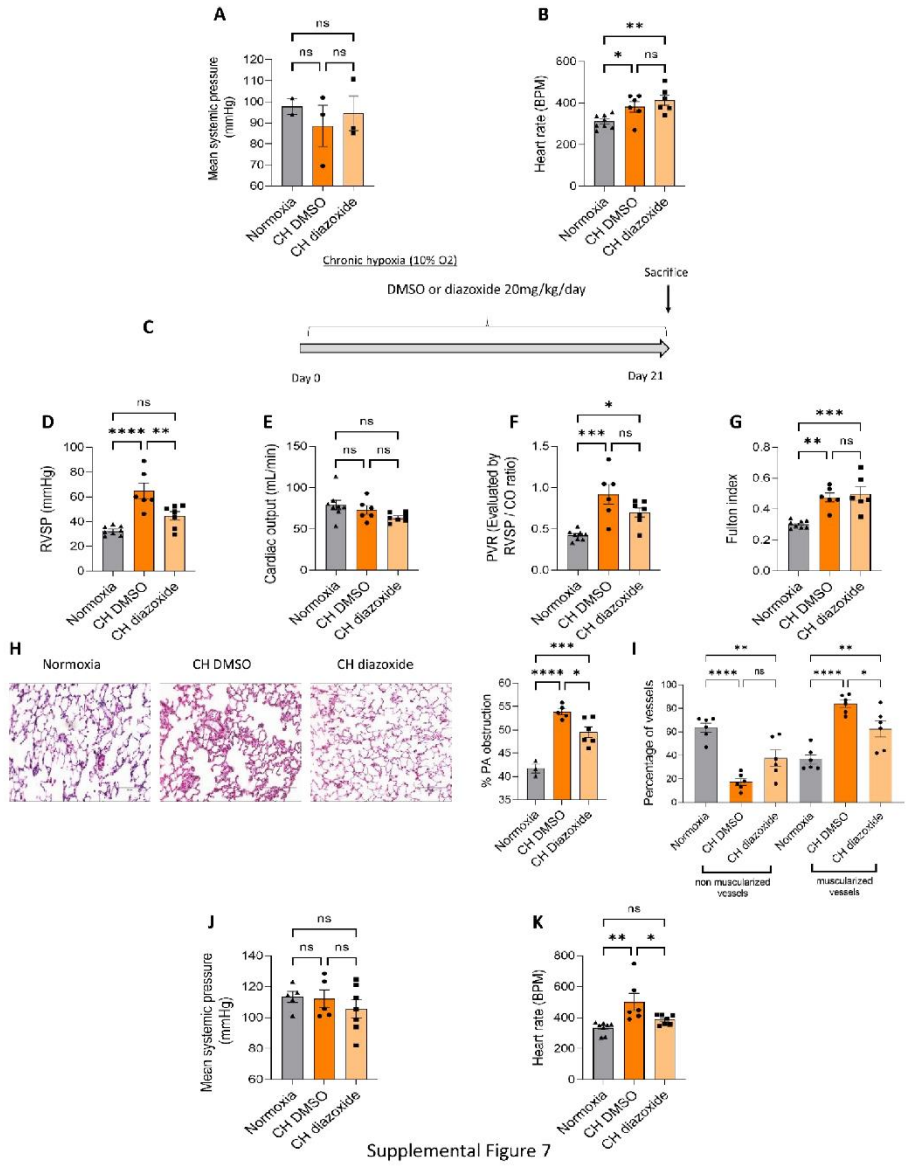
Supplemental figure 6

Supplemental Figure 6: Consequence of diazoxide treatment on systemic blood pressure, heart rate, and LV stroke volume in MCT-PH rats. Diazoxide (20 mg·kg−1·d−1 for 3 weeks) was administrated long term during MCT exposure by intraperitoneal injection. Then we measured the mean systemic blood pressure in the carotid artery (mmHg) (A), Heart rate (BPM) (B), and LV stroke volume (C) in control, MCT DMSO, and MCT diazoxide groups (n=5-7 rats per condition). Diazoxide (20 mg·kg−1·d−1 for day 14 to day 21) was administrated short term during MCT exposure by intraperitoneal injection. Then we measured the mean systemic blood pressure in the carotid artery (mmHg) (D), Heart rate (BPM) (E), and LV stroke volume (F) in control, MCT DMSO, and MCT diazoxide groups. (n=6-10 rats per condition). ns: non-significant *p< 0.05 **P<0.01; ***P<0.001.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

The difference between three groups was assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

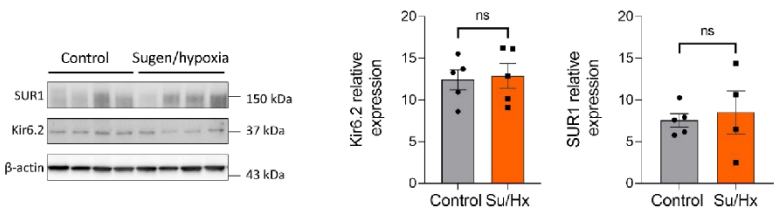


Supplemental Figure 7: Long-term in vivo chronic activation of SUR1 interferes with PH development induced by chronic hypoxia (CH)-exposure. (A) Mean systemic blood pressure in the

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

carotid artery (mmHg) (B) Heart rate (BPM) after short term *in vivo* treatment with diazoxide in CH-Rats. (C) In vivo experimental design, diazoxide (20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ for day 0 to day 21) was administrated long term during CH exposure by intraperitoneal injection. (D) RVSP (mm Hg; n=6-7 different rats per condition) (E), CO (mL/min) (n=-6-7 rats per condition). (F) PVR (n=6-7 rats per condition) (G), Fulton index (n=6-7 rats per condition). (H) Pulmonary vessel occlusion (%) analysed by hematoxylin-eosin Safran staining (HES) (n=4–7 rats per condition). (I) Percentage of non-muscularized and muscularized vessels (100 vessel per rat, (n=4-7 rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. Mean systemic blood pressure in the carotid artery (mmHg) (J), Heart rate (BPM) (K). ns: non-significant $*P< 0.05$ $**P<0.01$; $***P<0.001$. The difference between three groups was assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

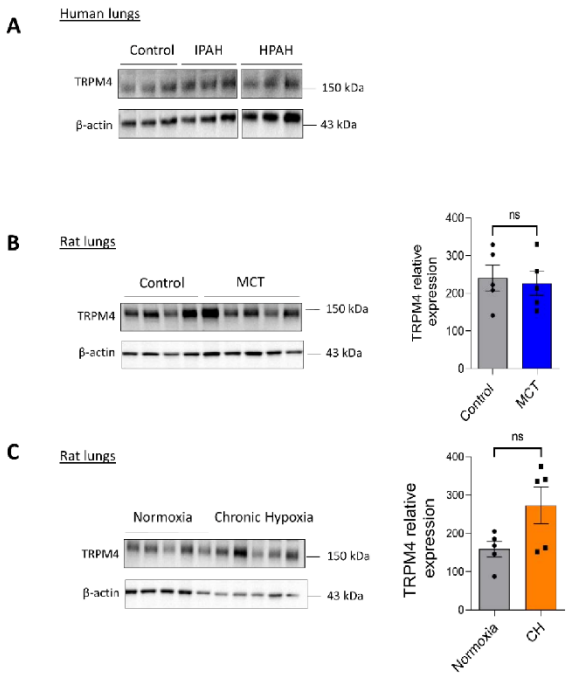
AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental figure 8

Supplemental figure 8: Analysis of SUR1 and Kir6.2 protein expression in lung from CH and Su/Hx rats Representative Western blots of SUR1 and Kir6.2 in lung from control and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-exposed rats (8 weeks). Quantification of SUR1 and Kir6.1 expression in lungs from control and Su/Hx rats (n=4-5). ns: non-significant. Difference between two groups was assessed by two-tailed unpaired Student's t-tests.

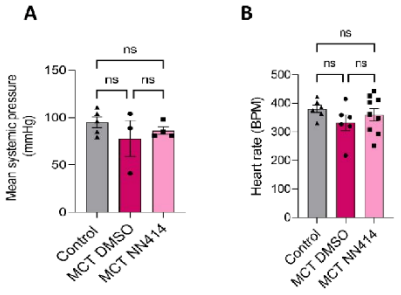
AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental figure 9

Supplemental Figure 9: **Expression of *TRPM4 in lung from PAH patients and MCT- and CH-PH rats***. (A) Representative Western blots and quantification of TRPM4 in lung from control, iPAH, and hPAH patients. (n=5-6). (B) Representative Western blots and quantification of TRPM4 in lung from control and MCT-PH rats. (n=5). (C) Representative Western blots and quantification of TRPM4 in lung from normoxia and Chronic-hypoxia (CH) rats (n=5). ns: non-significant. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between two groups. The difference between three groups was assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society



Supplemental Figure 10: Consequence of NN414 treatment on systemic blood pressure and heart rate in MCT-PH rats. NN414 (1.5 mg/kg/day twice daily for day 14 to day 21) was administrated short term during MCT exposure by intraperitoneal injection. Then we measured the mean systemic blood pressure in the carotid artery (mmHg) (A) and heart rate (BPM) (n=3-9) in rats per condition). ns: non-significant. The difference between three groups was assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

AJRCMB Articles in Press. Published February 17, 2022 as 10.1165/rcmb.2021-0180OC
Copyright © 2022 by the American Thoracic Society

PROJET 3: Involvement of SUR2/Kir6.1 in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension

Auteurs : **Hélène Le Ribeuz**, Bastien Masson, Mary Dutheil, Antoine Beauvais, Angèle Boët, Véronique Capuano, Olaf Mercier, Marc Humbert, David Montani, and Fabrice Antigny

État : En préparation

1. Rationnel

Suite à notre étude sur le rôle de SUR1/Kir6.2 dans la physiopathologie de l'HTAP où nous avons démontré que l'activation de SUR1 dans l'HTAP pourrait être une voie thérapeutique intéressante, nous avons voulu déterminer si le KATP SUR2/Kir6.1 pouvait lui aussi être impliqué dans l'HTAP. En effet il est connu que la sous-unité SUR2B est présent au niveau des CMLs d'artères systémiques, mais pas au niveau des APs. De plus, dans notre précédente étude nous avons utilisé comme activateur de SUR1, le diazoxide qui a été démontré pour pouvoir également activer SUR2 suivant certaines concentrations. Comme décrit précédemment d'autres études ont déjà démontré l'impact de l'activation non spécifique des KATP dans les modèles de rats MCT et hypoxie chronique (nicorandil et iptakalim).

2. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle du KATP SUR2/Kir6.1 dans la physiopathologie de l'HTAP est étudiant son expression dans les cellules vasculaires pulmonaires humaines et dans les modèles animaux d'HTP, d'analyser *in vitro* l'impact de l'activation de ce canal sur les fonctions biologiques des CML-APs et CE-APs comme la prolifération et la migration. D'étudier *ex-vivo* le rôle de SUR2 dans la régulation du tonus des APs humaines et de rats et enfin d'évaluer *in vivo* le rôle de SUR2 sur le développement de l'HTP.

1. Méthodes

Nous avons réalisé des marquages par immunofluorescence sur des coupes de poumons humains contrôles et de patients atteints d'HTAP afin d'évaluer l'expression et la localisation de SUR2B, SUR2A et Kir6.1 au niveau vasculaire pulmonaire

Par RT-qPCR nous avons mesuré l'expression de l'ARNm de ABCC9 et KCNJ8 dans les poumons et VD humains de patients contrôles et de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les poumons de rats contrôles ou exposés à la MCT.

Des expériences de Western blot ont été réalisées sur des échantillons protéiques de poumons et d'APs humaines contrôles et HTAP, ainsi que sur des échantillons de CE-APs et CML-APs de de patients contrôles et de patients atteints d'HTAP. Nous avons également réalisé des Western blots sur des échantillons de poumons, VG et VD de rats contrôles et exposés à la MCT.

In vitro nous avons quantifié la prolifération des CE-APs et CML-APs par un test d'incorporation du BrdU en présence ou en absence de pinacidil (activateur de SUR2) à 10µM. Nous avons également analysé les conséquences de l'activation de SUR2 par le pinacidil sur la capacité migratoire des CE-APs et CML-APs par un test de wound healing.

Ex vivo, nous avons analysé les conséquences de l'activation de SUR2 par le pinacidil sur le tonus artériel pulmonaire de rats contrôles ou exposés à la MCT.

Nous avons analysé l'expression et la localisation SUR2B, SUR2A et Kir6.1 au niveau du VD et du VG de rats contrôles ou exposés à la MCT. Nous avons également mesuré la conséquence de l'activation de SUR2 sur la durée des potentiels d'actions de cardiomyocytes fraichement isolés de VD de rats contrôles par patch-clamp.

Enfin, nous avons analysé les conséquences de l'activation de SUR2 *in vivo* par le pinacidil (1mg/Kg/jour) sur des rats contrôles ou exposées à la MCT.

2. Résultats

Les immunomarquages ont révélé que SUR2B, SUR2A et Kir6.1 sont bien exprimés au niveau des CE-APs et CML-APs de patients contrôles et de patients atteints d'HTAP. L'ARNm de ABCC9 et KCNJ8 n'est pas modifié dans les poumons de patients atteints d'HTAP. Par Western blot, nous avons également démontré que l'expression protéique de SUR2B, SUR2A et Kir6.1 était similaire dans les poumons de patients atteints d'HTAP. Toujours par Western blot, nous

avons montré que les expressions de SUR2A et SUR2B étaient inchangées dans les CE-APs isolées de patients atteints d'HTAP alors que l'expression de Kir6.1 était augmentée. Puis *in vitro*, nous avons montré que les CE-APs contrôles ont une prolifération diminuée en présence de pinacidil alors qu'il n'y a pas d'incidence sur la prolifération des CE-APs HTAP. Nous montrons également que l'activation de SUR2 n'a pas d'impact sur la migration des CE-APs contrôles et HTAP.

Au niveau des CML-APs, par Western blot, nous montrons que l'expression de Kir6.1 est inchangée dans les CML-APs HTAP alors que l'expression de SUR2B tend à augmenter, mais de manière non significative, et que l'expression de SUR2A est augmentée. L'activation de SUR2 induit une diminution de la prolifération des CML-APs contrôles et HTAP et également une diminution de la capacité migratoire des CML-APs contrôles sans impacter celle des CML-APs HTAP.

Nous avons démontré ensuite que l'ARNm de ABCC9 est diminué dans les poumons de rats MCT tandis que l'expression de KCNJ8 est inchangée. Par western blot, nous montrons une forte diminution de l'expression de SUR2A dans les poumons de rats exposés à la MCT, tandis que l'expression de SUR2B est inchangée et celle de Kir6.1 est augmentée. Par des expériences de myographe nous avons analysé la contractilité des APs de rats contrôle et MCT et nous avons mis en évidence qu'en présence de pinacidil, la contraction des APs par la dose réponse KCL est retardée ce qui est associé à un EC50 augmenté. En réalisant une dose réponse au pinacidil sur des APs précontractées à l'U46619 nous avons observé une relaxation importante des APs contrôles et qui est augmentée dans les APs de rats exposés à la MCT, suggérant que la relaxation des APs MCT, induite par le pinacidil, provient de l'activation de SUR2B, SUR2A étant très diminuée dans les poumons MCT.

Au niveau cardiaque, nos immunomarquages indiquent que SUR2B est peu exprimé dans le VD de rat contrôles, alors que Kir6.1 et SUR2A semblent être plus fortement exprimés.

L'activation de SUR2 par le pinacidil dans les cardiomyocytes de rats contrôles entraine un raccourcissement de la durée de repolarisation du potentiel d'action a -60mV (repolarisation tardive).

Par western blot, nous avons mis en évidence une diminution d'expression de SUR2A dans le VD de rat MCT et pas de différence d'expression de Kir6.1. Comme visualisé par immunofluorescence, l'expression de SUR2B n'est pas quantifiable dans le VD de rat contrôle

et MCT. Par RT-qPCR nous avons observé que l'ARNm de ABCC9 et KCNJ8 était inchangé dans le VD de rats MCT.

Finalement, nous avons analysé les conséquences de l'activation pharmacologique de SUR2, *in vivo*, avec le pinacidil (1mg/kg/jour) sur des rats exposés à la MCT. Un traitement préventif (J1-21) au pinacidil a permis d'améliorer les paramètres hémodynamiques tels que les PVDs, le débit cardiaque et les résistances pulmonaires. L'index de Fulton était également réduit comparé aux rats MCT traités au DMSO. Nous avons pu observer une diminution du remodelage vasculaire et de la neomuscularisation des APs. Au niveau du VD nous avons également observé une amélioration de la fibrose cardiaque des rats MCT traités au pinacidil. Ensuite, nous avons réalisé la même expérience sur un protocole court de traitement au pinacidil (7jours) de j14 à j21 après l'injection de MCT. Les résultats ont démontré une amélioration des PVDs, mais pas du débit cardiaque, ainsi qu'une amélioration des résistances vasculaires pulmonaires et du fulton. Le remodelage vasculaire était également diminué tout comme la neomuscularisation.

Pour finir le traitement de rats contrôles au pinacidil pendant 21 jours a permis de démontrer la relative « sureté » de cette molécule, car nous n'avons seulement observé une augmentation du rythme cardiaque chez les rats exposés au pinacidil sans altération des paramètres hémodynamiques du VD ni de remodelage des APs.

3. Discussion

Dans cette étude nous avons montré que SUR2B, SUR2A et Kir6.1 sont exprimés dans les CML-APs et CE-APs et que l'activation de SUR2 diminue la proliferation et migration des CML-APs contrôle. Nous avons également démontré que SUR2/Kir6.1 contribue au tonus des APs isolées de rats contrôles et MCT. Au niveau cardiaque, nous avons montré que SUR2A et Kir6.1 sont exprimés dans le VD de rat et que le canal SUR2A/Kir6.1 contribue à la repolarisation du potentiel d'action des cardiomyocytes du VD. Enfin, le traitement *in vivo* au pinacidil de rats contrôles a prouvé la relative « sureté » de cette molécule chez le rat et le traitement en préventif et curatif au pinacidil de rats MCT a permis de réduire le développement de l'HTP chez le rat.

SUR2A et SUR2B présentent 99% d'homologie, cependant ils sont décrits pour être exprimés dans des tissus différents et ils n'ont pas les mêmes sensibilités à l'ATP, ni à certaines molécules activatrices ou inhibitrices. SUR2A est décrit pour être très exprimé dans le tissu

cardiaque, le muscle squelettique et le cerveau(Zhou et al. 2012). SUR2B quant à lui est principalement décrit pour être exprimé au niveau vasculaire systémique, dans plusieurs types d'artères et de veines et dans le muscle squelettique(L. Li, Wu, et Jiang 2003). Nous avons montré dans cette étude que SUR2B, SUR2A et Kir6.1 sont bien présents dans les poumons humains et de rats ainsi que dans les CML-APs et CE-APs humaines. SUR2B et SUR2A sont associés le plus souvent avec Kir6.1, mais ils peuvent également s'associer avec Kir6.2. Nous avons précédemment montré que Kir6.2 est exprimé dans les CML-APs et CE-APs de patients contrôles et qu'il est augmenté dans les CML-APs HTAP. Nous pouvons supposer qu'au niveau des vaisseaux pulmonaires SUR2A et SUR2B peuvent également s'associer avec Kir6.2 ce qui pourrait entrainer des modifications de leurs propriétés électrophysiologiques, et avoir un rôle important dans le contexte de l'HTAP, car nous avons précédemment démontré l'augmentation de l'expression de Kir6.2 dans les CML-APs HTAP.

Au niveau cardiaque, il est connu que SUR2A, SUR2B et Kir6.1 sont exprimés dans le VG, mais aucune d'étude n'a étudié leur localisations et expressions dans le VD. Nous avons démontré que SUR2B est très faiblement exprimé, ce qui suggère une association SUR2A/Kir6.1 dans le VD. Dans le VG, SUR2A et SUR2B sont localisés au niveau des mitochondries ce qui confirme leur rôle de cardioprotection. La contribution de SUR2A/Kir6.1 au potentiel d'action des cardiomyocytes et son role au niveau des mitochondries pourrait jouer un rôle de cardioprotection chez les rats MCT. Néanmoins, nous avons mis en évidence que l'expression de SUR2A est diminuée dans le VD des rats MCT. Il serait intéressant de regarder si l'activation du canal par le pinacidil peut réussir à modifier la durée du potentiel d'action de cardiomyocytes de VD de rats MCT.

Récemment, des mutations gain de fonction dans le gène *ABCC9* ont été identifiées pour être la cause du syndrome de Cantu, une maladie caractérisée par une hypertrichose, une osteochondroplasie et plusieurs anomalies cardiaques comme une cardiomégalie, des vaisseaux dilatés et tortueux et une effusion péricardique. Certains patients développent également une HTP(Harakalova et al. 2012; McClenaghan, Woo, et Nichols 2019). Le mécanisme physiologique aboutissant à cette HTP est complexe et pas totalement élucidé. La principale hypothèse serait que cette suractivation de SUR2/Kir6.1 entraine une forte relaxation des artères systémiques et une hypotension. Ce premier phénotype va amener à un mécanisme compensatoire du cœur qui va augmenter son débit cardiaque, ce qui entraine à terme une hypertrophie du cœur et pouvant aller jusqu'à augmenter les pressions dans l'AP.

Certains patients développent également une HTP liée à leur cardiopathie du cœur gauche (HTP du groupe 2). Néanmoins, nous n'avons observé aucune altération hémodynamique ni de défaut du cœur chez des rats contrôles exposés 21 jours au pinacidil.

4. Conclusion

Pour conclure nous avons mis en évidence que l'activation pharmacologique de SUR2 réduit la prolifération des CML-APs isolées de patients atteints d'HTAP et entraine une relaxation des APs de rats contrôles, mais également traités à la MCT ce qui montre que le canal est toujours fonctionnel en condition pathologique.

De plus, nous montrons que l'activation de SUR2 *in vivo* réduit le phénotype HTP des rats exposés à la MCT. Ces résultats font de SUR2, une cible intéressante pour le traitement de l'HTAP.

Involvement of SUR2/Kir6.1 in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension

Short title: SUR2/Kir6.1 in PAH

Hélène Le Ribeuz[1,2], Bastien Masson[1,2], Mary Dutheil[1,2,3], Angèle Boët[1,2], Antoine Beauvais[1,2], Vincent Thomas De Montpreville[4] Véronique Capuano[1,2,3], Olaf Mercier[5], Marc Humbert[1,2,6] David Montani[1,2,6] and Fabrice Antigny[1,2]

[1]*Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France (H.L-R, M.D, A.B, V.C, M.H, D.M, and F.A)*

[2]*INSERM UMR_S 999 « Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France (H.L-R, M.D, A.B, V.C, M.H, D.M, and F.A)*

[3]*Hôptal Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France (M.D, V.C)*

[4]*Department of Pathology, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France (V.D-M)*

[5]*Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France. (O.M)*

[6]*Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France. (M.H, D.M)*

Corresponding author: Fabrice Antigny, INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. Tel.: (33) 1 40 94 22 99, e-mail: fabrice.antigny@inserm.fr

Abstract

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe and rare cardiopulmonary disease defined by an elevation of the mean pulmonary artery pressure >20 mmHg. Potassium (K^+) channels are crucial players in PAH's pathobiology. We recently found that ATP-sensitive K^+ channels (KATP) regulatory subunit ABCC8 could be considered a new therapeutic target for PAH. In the present study, we hypothesized that the second KATP regulatory subunit (ABCC9) also contributes to PAH pathogenesis. *ABCC9* gene encodes two regulatory subunits of KATP channels, the SUR2A and SURB proteins. To be KATP channel, classically, SUR2 subunits are associated with the K^+ channel Kir6.1. We investigated how the SUR2/Kir6.1 channel contributes to PAH pathogenesis and their potential interest as a therapeutic target against PAH.

Methods: Using a combination of *in vitro*, *ex vivo,* and *in vivo* approaches, we analyzed the localisation and expression of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in pulmonary vasculature from control and PAH patients as in experimental PH in rat models. We also analyzed the role of SUR2/Kir6.1 in PAH physiopathology (proliferation, migration, and contraction). Finally, we deciphered the consequences of *in vivo* pharmacological activation of SUR2/Kir6.1 in the monocrotaline (MCT)-induced PH model.

Results: We demonstrated that SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 are expressed (mRNA and protein) in lungs from control and PAH patients and in MCT induced-PH model. Myograph experiments demonstrated that pharmacological activation of SUR2 by pinacidil induced pulmonary arterial relaxation in human and rat isolated pulmonary arteries. *In vitro* experiments on human pulmonary arterial smooth muscle cells and endothelial cells (hPASMCs and hPAECs) from control and PAH patients show decreased cell proliferation and migration after SUR2 activation (pinacidil). Using the patch-clamp technique, we demonstrated that SUR2 activation (pinacidil) in adult rat right ventricular (RV) cardiomyocytes reduces RV action potential. Chronic pinacidil administration in control rats increased heart rate without changes in RV in cardiovascular hemodynamic parameters. Finally, *in vivo* pharmacological activation of SUR2 by pinacidil (1mg/kg/day) on MCT induced-PH rats show an improvement of the hemodynamic parameters as the mean RV systolic pressure during the preventive and curative protocol.

Keywords: SUR2, ABCC9, pulmonary arterial tone, migration, proliferation, metabolism

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex and severe disease. PAH is now defined by an elevation of the mean pulmonary artery (PA) pressure >20 mmHg and by a pulmonary vascular resistance (PVR) >3 Wood units at rest and by a PA wedge pressure ≤15 mmHg[1]. PAH is a complex and multifactorial disease that is the consequence of the progressive increase of PVR, consequently narrowing of the distal PA (diameter <500 µm) leading to right ventricular (RV) hypertrophy and RV failure and death[3]. More than 20 PAH-predisposing genes have been identified in PAH during the last two decades, including two potassium channels: *KCNK3* (Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 3) and *ABCC8* (ATP-binding cassette subfamily C member 8) [4]–[6]. *KCNK3* mutations are autosomal dominant inheritance with incomplete penetrance[7]. *KCNK3* encodes for a member of the superfamily of potassium channel proteins that contain two pore-forming P domains (K2P), the TASK-1 channel. At least 19 patients have been identified with 12 different *KCNK3* mutations in different cohorts of patients with PAH[8]. All mutations led to loss-of-function (LOF) of the TASK1 channel, indicating that TASK-1 LOF at least predisposes to the development of PAH. Since identifying *KCNK3*, several studies revealed the critical role of TASK1 in the pulmonary vasculature and RV compartment[9]–[11]. In 2018, Bohnen et al. identified 12 mutations in *ABCC8* [6]. The *ABCC8* gene encodes the SUR1 protein, a regulatory subunit of ATP-sensitive-K^+ channels (KATP). *ABCC8* mutation carriers are younger at the diagnosis than those with idiopathic PAH (median age at diagnosis 14 vs. 42 years old)[6]. KATP channels are composed of four Kir6.x (Kir6.1 and Kir6.2) channels and four sulfonylurea receptor subunits (SUR1, SUR2A, and SUR2B)[12]. SUR1 is mainly coupled to the Kir6.2 K^+ channel. We have provided the proof-of-concept that SUR1 activation should be considered as therapeutic target for PAH[13].

As the pharmacological SUR1 activators used in previous study[13] could also weakly activate SUR2, we hypothesized that SUR2 and Kir6.1 could be additional actors in the pulmonary circulation and PAH pathogenesis. We investigated the expression, localization, and function of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in control and PAH-human pulmonary arterial endothelial cells (hPAECs) and human pulmonary arterial smooth muscles cells (hPASMCs) and experimental models of PH. We evaluated the consequences of SUR2/Kir6.1 channel activation in human PASMCs and PAECs proliferation rate and

migration. We assessed the role of SUR2/Kir6.1 channel in pulmonary arterial tone using organ bath studies in isolated PA from control rats and the well-established monocrotaline (MCT)-induced PH rat model (MCT-PH). Additionally, we assessed the effect of pharmacological activation of SUR2 on healthy rats and the development of experimental PH.

Materials and methods

Because of space limitations, a detailed description of the Materials and Methods is presented in the Online Supplement.

Results

The SUR2/Kir6.1 channel is expressed in lungs from PAH patients. To examine the expression and the localization of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in lungs from control and PAH patients, we performed immunostaining in paraffin-embedded lung sections of controls and PAH patients (Figure 1A). In both conditions, we found that SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 are expressed in hPAECs (blue arrow) and hPASMCs (yellow arrow). Then, we quantified the relative amount of ABCC9 and KCNJ8 (coding for Kir6.1) at mRNA levels in lungs from control and PAH patients. We found that the mRNA levels of *ABCC9* and *KCNJ8* were unchanged in the lungs of PAH patients (Figure 1B). We performed Western blots using proteins from control and PAH patients to judge the relative quantity of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in lung tissues (Figure 1C). We found that the SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 protein was expressed at the same levels in PAH and control lung tissues (Figure 1C).

SUR2/Kir6.1 channel pharmacological activation reduced the proliferation in control hPAECs. As revealed by immunostaining, SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 are expressed in hPAECs. We quantified by Western blot their relative expression in primary hPAECs. As illustrated in Figure 2A, SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 protein were expressed in control and PAH-hPAECs. Compared to control-PAECs, SUR2A and SUR2B protein expression were unchanged, while Kir6.1 protein expression was increased in PAH-hPAECs (Figure 2B). Therefore, we evaluated the role of SUR2 in hPAECs proliferation and migration following pharmacological activation of SUR2 with pinacidil (10 µmol/L) for 24 hours. Interestingly, we found that pharmacological activation of SUR2 reduced the proliferation rate of

control-hPAECs without altering the proliferation of PAH-hPAECs (Figure 2C-D). In control and PAH hPAECs, we found that SUR2 activation by pinacidil had no consequence on the migration capacity of hPAECs (Figure 2F-H)

SUR2/Kir6.1 channel pharmacological activation reduced the proliferation and migration of control and PAH-hPASMCs.

Figure 3A confirmed that SUR2A, SUR2B, and Kir6.2 proteins were expressed in control and PAH-hPASMCs. However, SUR2A seemed to be expressed at a low level in the control condition while its expression was increased in PAH-hPASMCs. SUR2B expression in PAH-PASMCs tends to increase but not significatively ($p=0.053$). Kir6.1 protein expression was unchanged in PAH-hPASMCs (Figure 3A-B). We found that pharmacological activation of SUR2 reduced the proliferation rate of hPASMCs similarly in control and PAH conditions (Figure 3C-D). In control-hPASMCs, we showed that SUR2 activation by pinacidil reduced the migration capacity of control-hPASMCs but not in PAH-hPASMCs (Figure 3E-H).

Pharmacological activation of SUR2 produces pulmonary artery (PA) relaxation in control and MCT-PH rats. In the lungs from MCT-PH rats, we found that the mRNA level of ABCC9 was reduced, while KCNJ8 mRNA was unchanged (Figure 4A-B). In addition, in lungs from MCT-PH rats, SUR2A expression was severely reduced, SUR2B expression was unchanged, while Kir6.1 was increased (Figure 4C-D).

We next investigated the consequence of SUR2 activation in the contraction and the relaxation of isolated PA from control and MCT-PH rats. In control PA, we found that the contractile response to increasing doses of KCl (from 10 to 90 mmol/L) was significantly shifted to the right in the presence of pinacidil (Figure 4E), as indicated by increased EC50 values (Figure 4E). A similar result was obtained with PA isolated from MCT-PH rats (Figure 4F) (Supplemental Figure 1). We also measured the consequence of SUR2 activation on the relaxation of PA. After pre-contraction of PA with 1 µmol/L U46619, we applied increasing concentrations (100 nmol/L to 100 µmol/L) of pinacidil or DMSO. As shown in Figure 4G, in the control condition, the PA contraction is progressively reduced by increasing the dose of pinacidil (until almost total PA relaxation) compared to DMSO, indicating that SUR2

activation mediated PA relaxation attested by the decrease in PA contraction (Figure 4H). Similar results were obtained in PA isolated from MCT-PH rats (Figure 4F) (Supplemental figure 1).

SUR2 activation induces more potent relaxation in PA from MCT-PH rats than in control conditions, suggesting that in MCT-PH rats, pinacidil-mediated PA relaxation is mainly dependent on SUR2B expression, while SUR2A expression is impaired in MCT-PH rats.

As presented in Supplemental Figure 2A, in the absence of endothelium and after preconstriction of PA with U46619, the relaxation mediated by diazoxide is reduced by 40% (Supplemental Figure 2B), suggesting that the endothelial SUR2 also contributes to PA arterial tone.

Expression of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in the heart from MCT induced-PH rats. Because SUR2 and Kir6.1 are known to be expressed in the heart, we performed immunostaining experiments to visualize the expression of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 protein in RV tissues from control rats (Figure 5A). The SUR2B staining intensity appears lower than SUR2A and Kir6.1 (Figure 5A), suggesting a lower expression of SUR2A in the RV compartment. SUR2B and Kir6.1 protein appear primarily localized in a striated manner. Moreover, Kir6.1 seems to be localized in the perinuclear area (Figure 5A). We performed Western blot experiments in RV tissues to better quantify SUR2 and Kir6.1 protein expression in RV from control and MCT-PH rats. Compared to control RV rats, we found a reduced expression of SUR2A in MCT-PH rats (Supplemental Figure 3A), and an unchanged expression of Kir6.1.

Regarding SUR2B, as suggested by immunostaining, SUR2B protein level seems to be very low in RV from control and MCT-PH rats (its expression was not quantifiable), in contrast to LV tissues, where SUR2B appears to be strongly expressed (Supplemental Figure 3B). Moreover, in the LV, we found SUR2A protein was also decreased in LV from MCT-PH rats, while SUR2B and Kir6.1 expression was unchanged in LV from MCT-PH rats (Supplemental Figure 3B).

To determine the contribution of SUR2 in the repolarizing phase of RV action potential, we measured the effect of the pinacidil on action potential duration (APD). The pinacidil application led to a shortening of APD without changes in resting membrane potential (Figure 5B, left panel). In control RV cardiomyocytes, APD at 0 mV and -30 mV were not affected by the pharmacological activation of SUR2

(Figure 5B, middle panel). In contrast, APD at –60 mV was significantly decreased (Figure 7B, right panel).

In healthy rats, *in vivo* pharmacological activation of SUR2 is safe at the cardiovascular level- To evaluate the consequence of *in vivo* pinacidil application on control rats, we chronically exposed control rats to 1 mg/kg/d for 3 weeks (Figure 5C). I*n vivo* chronic activation of SUR2 had no pulmonary vascular consequence, as indicated by similar right ventricular systolic pressure (RVSP), cardiac output (CO), pulmonary vascular resistance (PVR) evaluated by calculating the RVSP/CO ratio and RV hypertrophy (evaluated by Fulton index values) (Figure 5D-G). Pulmonary vessel remodeling and neomuscularization were not affected by pinacidil application (Figure 5H-I).

Associated with pinacidil-induced reduce APD in RV cardiomyocytes, we found an increased heart rate and cycle length in pinacidil-exposed rats. Consequently, pulmonary artery acceleration time (PAAT) and RV ejection time (RVET) were reduced, while PAAT/RVET ratio was unchanged (Table 1). All the other measured parameters were unchanged, including RV and LV thickness and LV and RV diameters (Table 1).

***In vivo* preventive pharmacological activation of SUR2 reduces the development of PH induced by MCT.** In the present study, we found that SUR2 activation reduced the proliferation rate of PAH-hPASMCs and caused PA relaxation in MCT-PH rats. Therefore, we assessed the consequences of *in vivo* pharmacological activation of the SUR2 channel in MCT-PH rats (Figure 6A). We administered pinacidil 1 mg/kg/day *in vivo* from days 1 to 21 to MCT-PH rats (Figure 6A). In MCT pinacidil rats compared to MCT DMSO rats, we found a reduction in the RVSP (Figure 6B), an increase in CO (Figure 5C), a decrease in PVR (Figure 6D), a reduction of RV hypertrophy (Figure 6E). *In vivo* preventive treatment with pinacidil also reduced aberrant wall thickness of muscularized pulmonary vessels induced by MCT exposure (Figure 6F) and reduced the pulmonary vessels' neomuscularization, as attested by the increased non-muscularized vessels and the decreased muscularized vessels (Figure 6G). At RV level, we also found that preventive pinacidil treatment strongly reduced RV fibrosis compared to MCT-DMSO rats (Figure 6H).

***In vivo* curative pharmacological activation of SUR2 reduces the severity of PH induced by MCT.**

Moreover, when administered *in vivo* from days 14 to 21 to MCT-PH rats (Figure 7A), pinacidil significantly reduced RVSP (Figure 7B the RVSP/CO ratio (Figure 7D), and Fulton index (Figure 7E)., but not CO (Figure 7C). Additionally, i*n vivo* curative treatment with pinacidil reduced the pulmonary vascular remodeling induced by MCT exposure (Figure 7F) and pulmonary vessels neomuscularization (Figure 7G). At RV levels, we found that curative pinacidil treatment did not significantly reduce RV fibrosis compared to MCT-DMSO rats (Figure 7H). Together, these results suggest that pinacidil treatment reduces the severity of PH in MCT-exposed rats.

Discussion

We have provided several essential findings related to SUR2/Kir6.1 expression/function in the context of PAH. First, SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 are expressed in hPASMCs and in hPAECs. Second, SUR2 pharmacological activation reduces the proliferation of hPASMCs and hPAECs and the migration of hPASMCs. Third, SUR2 pharmacological activation produces PA relaxation in rat Pas from control and PH condition. Fourth, SUR2A and Kir6.1 are highly expressed at the RV level and contribute to action potential repolarization in the control condition. Fifth, chronic *in vivo* SUR2 activation with pinacidil increased heart rate without disturbing pulmonary circulation hemodynamic in control rats'. Finally, *in vivo* activation of SUR2 reduces the development of PH in the MCT-PH rat model.

SUR2A/SUR2B localization expression

SUR2A shares 99% of homology with SUR2B [14]. However, they have different localization and sensitivities to ATP. In absence of pinacidil, when SUR2B is associated with Kir6.1, this channel is not inhibited by ATP but is stimulated by ADP and ATP [15]. Moreover, the IC50 for ATP of SUR2A and SUR2B are 100 and 300 µM, respectively [16]. Regarding their different localization, SUR2A is predominant in the heart, skeletal muscle, and brain [17], [18], while SUR2B is more ubiquitous. *In situ* hybridization technique indicated that SUR2B and Kir6.1 mRNA are found in many systemic but not PAs [19]. Here we demonstrated for the first time that SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 are expressed in human and also in rat lung tissues and isolated hPAECs and hPASMCs from control and PAH patients. SUR2A and SUR2B are predominantly associated with Kir6.1, but they can also be associated with Kir6.2, commonly associated with SUR1. We recently found that Kir6.2 is expressed in hPAECs and

hPASMCs from control and PAH patients and that Kir6.2 is increased in PAH-hPASMCs and in lungs from MCT-PH rats[13]. In the pulmonary vasculature, we could reasonably imagine that SUR2A or SUR2B can co-assemble with Kir6.1 and Kir6.2. Therefore the increase in Kir6.2 observed in the context of PAH may modify the properties of KATP[13].

SUR2 function in mitochondria

Zhou et al. demonstrated that SUR2A and SUR2B are localized in the cell membrane, endoplasmic reticulum (ER), and mitochondria[20]. By regulating cell bioenergetics, Ca^{2+} homeostasis, K^+ cycling [21], mitochondria play significant role in cardioprotection, cell cycle phase, and viability [22]. Mitochondria from *sur2*$^{-/-}$ mice are less polarized, exhibit more significant K^+ influx, greater reactive oxygen species production, and have greater tolerance to Ca^{2+} overload [23]. Thus, SUR2A and SUR2B are not only the regulatory subunits of plasma membrane KATP but could also act as regulatory subunits in mitochondrial KATP channels, which could play a crucial role in cardioprotection, ATP production, mitochondrial bioenergetic [24]. In hPASMCs and hPAECs we do not exclude that a part of pinacidil treatment benefice MCT-models provides via changing mitochondrial status.

SUR2 function in the RV

SUR2, Kir6.1, and Kir6.2 are expressed in the heart, where SUR2A/Kir6.2 predominate cardiac ventricular myocytes [25]. However, all current studies on the role of SUR2 in the heart are done in the LV compartment. We found that RV cardiomyocytes also expressed SUR2A, Kir6.2, and Kir6.1[13], while SUR2B expression seems to be at shallow levels in the RV compared to LV. Immunostaining reveals that SUR2A is localized in a striated manner while Kir6.1 is localized in the perinuclear area, suggesting that Kir6.1 could co-assemble with SUR2A in RV. LV cardiomyocytes from guinea-pig pinacidil application significantly shortened APD[26]. Inversely LV cardiomyocytes isolated from *kir6.2*$^{-/-}$ mice display a prolonged action potential in high glucose concentration than cardiomyocytes from WT mice [27]. Moreover, in LV from control rats, SUR2A and SUR2B appear localized in mitochondrial, indicating that KATP could also exert cardioprotection by their role as mitochondria KATP [20]. The role of the SUR2A/Kir6.1 channel in APD and cardiomyocytes mitochondria function may have cardioprotective consequences that could benefit from RV dysfunction occurring in MCT-PH

models [28, p. 3], [29, p. 3]. Indeed, we demonstrated an essential pathological prolongation of action potential duration in RV cardiomyocytes isolated from MCT-PH rats [30].

ABCC9 in Cantu syndrome

Recently, *ABCC9* gain of function mutations have been identified as the major genetic cause of Cantu syndrome, characterized by congenital hypertrichosis, osteochondroplasia, cardiomegaly, dilated vasculature, tortuous vasculature, and pericardial effusion. Interestingly, some patients with Cantu Syndrome have also developed pulmonary hypertension [31]–[34]. In contrast to *ABCC8* LOF mutations in PAH, the 12 different *ABCC9* mutations are gain-of-function mutations [31]. The pathophysiological mechanism involving the development of PH is complex. It consists of the fact that the constitutive opening of SUR2A/Kir6.1 leads to systemic vasorelaxation and hypotension, and the secondary opening of SUR2A/Kir6.1 leads to compensatory cardiac hypertrophy and hypercontractility and PH [25]. Moreover, some of these patients have also been diagnosed with PAH due to LV disease [35].

Here we found that daily pinacidil administration in control rats at 1 mg/Kg/day for three weeks has no consequences on hemodynamics parameters and pulmonary vascular remodeling. The echocardiographic measurement revealed an increase in the heart rate of the control rats treated with pinacidil without the development of PH. These results demonstrated that SUR2 activation could be a promising therapeutic target for PAH with close monitoring for cardiac parameters.

Conclusions

In conclusion, we show evidence that the SUR2 pharmacological activation reduces the proliferation and the migration capacity of PAH-hPASMCs and that SUR2 contributes to PA tone. Moreover, we offer that *in vivo* SUR2 activation effectively restores/ameliorates PH in MCT PH models. Despite the SUR2 gain of function mutation being a cause of cardiovascular abnormalities observed in patients suffering from Cantu syndrome, the present results prove that pharmacological activation of SUR2 should be considered in PAH.

Acknowledgments: The authors thank Yvonne Dutheil from INSERM U999, Hôpital Marie Lannelongue, for her help.

Conflict of Interest: M.H. and D. M have relationships with drug companies, including Actelion, Bayer, GSK, Novartis, and Pfizer. In addition to being an investigator in trials involving these companies, other relationships include consultancy services and memberships to scientific advisory boards. The other authors have no conflicts of interest.

Sources of Funding: This study was supported by grants from the French association "Fédération Française de Cardiologie." This study was also supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), the University Paris-Saclay, the Marie Lannelongue Hospital, and the French National Agency for Research (ANR) (grant no. ANR-18-CE14-0023 (KAPAH). ANR-18-CE14-0023 supports HLR. B.M is supported by Therapeutic Innovation Doctoral School (ED569).

References

[1] G. Simonneau *et al.*, « Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 53, n° 1, janv. 2019, doi: 10.1183/13993003.01913-2018.

[2] E. M. T. Lau, E. Giannoulatou, D. S. Celermajer, et M. Humbert, « Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension », *Nature Reviews Cardiology*, vol. 14, n° 10, p. 603-614, oct. 2017, doi: 10.1038/nrcardio.2017.84.

[3] M. Humbert *et al.*, « Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives », *Eur. Respir. J.*, vol. 53, n° 1, janv. 2019, doi: 10.1183/13993003.01887-2018.

[4] M. Eyries *et al.*, « Familial pulmonary arterial hypertension by KDR heterozygous loss of function », *Eur. Respir. J.*, janv. 2020, doi: 10.1183/13993003.02165-2019.

[5] L. Southgate, R. D. Machado, S. Gräf, et N. W. Morrell, « Molecular genetic framework underlying pulmonary arterial hypertension », *Nat Rev Cardiol*, vol. 17, n° 2, p. 85-95, 2020, doi: 10.1038/s41569-019-0242-x.

[6] M. S. Bohnen *et al.*, « Loss-of-Function ABCC8 Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension », *Circ Genom Precis Med*, vol. 11, n° 10, p. e002087, 2018, doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002087.

[7] N. W. Morrell *et al.*, « Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension », *Eur Respir J*, vol. 53, n° 1, janv. 2019, doi: 10.1183/13993003.01899-2018.

[8] H. Le Ribeuz, V. Capuano, B. Girerd, M. Humbert, D. Montani, et F. Antigny, « Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension », *Biomolecules*, vol. 10, n° 9, sept. 2020, doi: 10.3390/biom10091261.

[9] F. Antigny *et al.*, « Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension », *Circulation*, vol. 133, n° 14, p. 1371-1385, avr. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.

[10] M. Lambert *et al.*, « Characterization of Kcnk3-Mutated Rat, a Novel Model of Pulmonary Hypertension », *Circ Res*, vol. 125, n° 7, p. 678-695, sept. 2019, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.314793.
[11] H. Le Ribeuz *et al.*, « Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells », *Int J Mol Sci*, vol. 21, n° 19, p. 7400, oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21197400.
[12] A. Wheeler *et al.*, « Coassembly of different sulfonylurea receptor subtypes extends the phenotypic diversity of ATP-sensitive potassium (KATP) channels », *Mol. Pharmacol.*, vol. 74, n° 5, p. 1333-1344, nov. 2008, doi: 10.1124/mol.108.048355.
[13] H. Le Ribeuz *et al.*, « SUR1 as a New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension », *Am J Respir Cell Mol Biol*, févr. 2022, doi: 10.1165/rcmb.2021-0180OC.
[14] C. Moreau, A.-L. Prost, R. Dérand, et M. Vivaudou, « SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers », *J Mol Cell Cardiol*, vol. 38, n° 6, p. 951-963, juin 2005, doi: 10.1016/j.yjmcc.2004.11.030.
[15] M. Yamada *et al.*, « Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K+ channel. », *J Physiol*, vol. 499, n° Pt 3, p. 715-720, mars 1997.
[16] N. Inagaki *et al.*, « Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart », *J Biol Chem*, vol. 270, n° 11, p. 5691-5694, mars 1995, doi: 10.1074/jbc.270.11.5691.
[17] W. A. Chutkow, M. C. Simon, M. M. Le Beau, et C. F. Burant, « Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels », *Diabetes*, vol. 45, n° 10, p. 1439-1445, oct. 1996, doi: 10.2337/diab.45.10.1439.
[18] M. Zhou, H.-J. He, O. Tanaka, M. Sekiguchi, K. Kawahara, et H. Abe, « Localization of the ATP-sensitive K(+) channel regulatory subunits SUR2A and SUR2B in the rat brain », *Neurosci Res*, vol. 74, n° 2, p. 91-105, oct. 2012, doi: 10.1016/j.neures.2012.08.005.
[19] L. Li, J. Wu, et C. Jiang, « Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats », *J Membr Biol*, vol. 196, n° 1, p. 61-69, nov. 2003, doi: 10.1007/s00232-003-0625-z.
[20] M. Zhou *et al.*, « Localization of sulfonylurea receptor subunits, SUR2A and SUR2B, in rat heart », *J Histochem Cytochem*, vol. 55, n° 8, p. 795-804, août 2007, doi: 10.1369/jhc.6A7104.2007.
[21] K. D. Garlid et P. Paucek, « The mitochondrial potassium cycle », *IUBMB Life*, vol. 52, n° 3-5, p. 153-158, nov. 2001, doi: 10.1080/15216540152845948.
[22] C. J. A. Ramachandra, S. Hernandez-Resendiz, G. E. Crespo-Avilan, Y.-H. Lin, et D. J. Hausenloy, « Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection », *EBioMedicine*, vol. 57, p. 102884, juill. 2020, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102884.
[23] N. T. Aggarwal, D. Pravdic, E. M. McNally, Z. J. Bosnjak, N.-Q. Shi, et J. C. Makielski, « The mitochondrial bioenergetic phenotype for protection from cardiac ischemia in SUR2 mutant mice », *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 299, n° 6, p. H1884-1890, déc. 2010, doi: 10.1152/ajpheart.00363.2010.
[24] K. D. Garlid, A. D. T. Costa, C. L. Quinlan, S. V. Pierre, et P. Dos Santos, « Cardioprotective signaling to mitochondria », *J Mol Cell Cardiol*, vol. 46, n° 6, p. 858-866, juin 2009, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.11.019.
[25] Y. Huang *et al.*, « Cardiovascular consequences of KATP overactivity in Cantu syndrome », *JCI Insight*, vol. 3, n° 15, p. 121153, août 2018, doi: 10.1172/jci.insight.121153.
[26] W. C. Cole, C. D. McPherson, et D. Sontag, « ATP-regulated K+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage », *Circ Res*, vol. 69, n° 3, p. 571-581, sept. 1991, doi: 10.1161/01.res.69.3.571.
[27] M. Suzuki *et al.*, « Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice », *J Clin Invest*, vol. 109, n° 4, p. 509-516, févr. 2002, doi: 10.1172/JCI14270.

[28] M. Lambert *et al.*, « Kcnk3 dysfunction exaggerates the development of pulmonary hypertension induced by left ventricular pressure overload », *Cardiovasc Res*, vol. 117, n° 12, p. 2474-2488, nov. 2021, doi: 10.1093/cvr/cvab016.
[29] M. Lambert *et al.*, « Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension », *Cardiovasc Res*, vol. 114, n° 6, p. 880-893, mai 2018, doi: 10.1093/cvr/cvy016.
[30] J. Sabourin *et al.*, « Ca2+ handling remodeling and STIM1L/Orai1/TRPC1/TRPC4 upregulation in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy », *J Mol Cell Cardiol*, vol. 118, p. 208-224, mai 2018, doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.04.003.
[31] M. Harakalova *et al.*, « Dominant missense mutations in ABCC9 cause Cantú syndrome », *Nat Genet*, vol. 44, n° 7, p. 793-796, juill. 2012, doi: 10.1038/ng.2324.
[32] D. Kobayashi, A. L. Cook, et D. A. Williams, « Pulmonary hypertension secondary to partial pulmonary venous obstruction in a child with Cantu syndrome », *Pediatr Pulmonol*, vol. 45, n° 7, p. 727-729, juill. 2010, doi: 10.1002/ppul.21215.
[33] A. Ma *et al.*, « Glibenclamide treatment in a Cantú syndrome patient with a pathogenic ABCC9 gain-of-function variant: Initial experience », *Am J Med Genet A*, vol. 179, n° 8, p. 1585-1590, août 2019, doi: 10.1002/ajmg.a.61200.
[34] C. McClenaghan *et al.*, « Cantu syndrome-associated SUR2 (ABCC9) mutations in distinct structural domains result in KATP channel gain-of-function by differential mechanisms », *J Biol Chem*, vol. 293, n° 6, p. 2041-2052, févr. 2018, doi: 10.1074/jbc.RA117.000351.
[35] C. McClenaghan, K. V. Woo, et C. G. Nichols, « Pulmonary Hypertension and ATP-Sensitive Potassium Channels », *Hypertension*, vol. 74, n° 1, p. 14-22, juill. 2019, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12992.

	DMSO (n=8)	Pinacidil (n=8)
HR (bpm)	326.1±15.42	372.6±14.07*
cycle lengh (ms)	159.4±5.52	143.3±3.19*
RVET (ms)	82.75±2.38	71.63±2.66**
PAAT (ms)	36.00±1.363	29±1.2**
PAAT/RVET) ms)	0.44±0.016	0.40±0.007
VTI Pulmonary Artery (mm)	5.30±0.29	4.875±0.16
RV EDd (mm)	6.24±0.26	6.72±0.26
RV EDs(mm)	1.47±0.28	1.84±0.13*
RV thickness (mm)	0.87±0.06	0.93±0.06
RV FS %	48.75±4.984	43.95±3.12
VTI aorta (mm)	7.38±0.28	7.09±0.38
Stroke Volume Ao (mL)	15.76±1.25	15.17±0.85
LV EDd (mm)	6.24±0.26	6.72±0.26
LV EDs(mm)	3.45±0.22	3.47±0.16
LV thickness (mm)	1.48±0.14	1.50±0.12

Table 1: Evaluation of RV and LV function by echocardiography measured in pinacidil or DMSO-exposed rats. HR: Heart rate, RVET: RV ejection time, PAAT: PA acceleration time, VTI: velocity-time integral, RV EDd: RV end-diastolic diameter, RV Eds: RV end-systolic diameter, RV FS: RV fractional shortening, LV EDd: LV end-diastolic diameter, LV Eds: LV end-systolic diameter, LV FS: LV fractional shortening. ns: non-significant. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

Figure legends

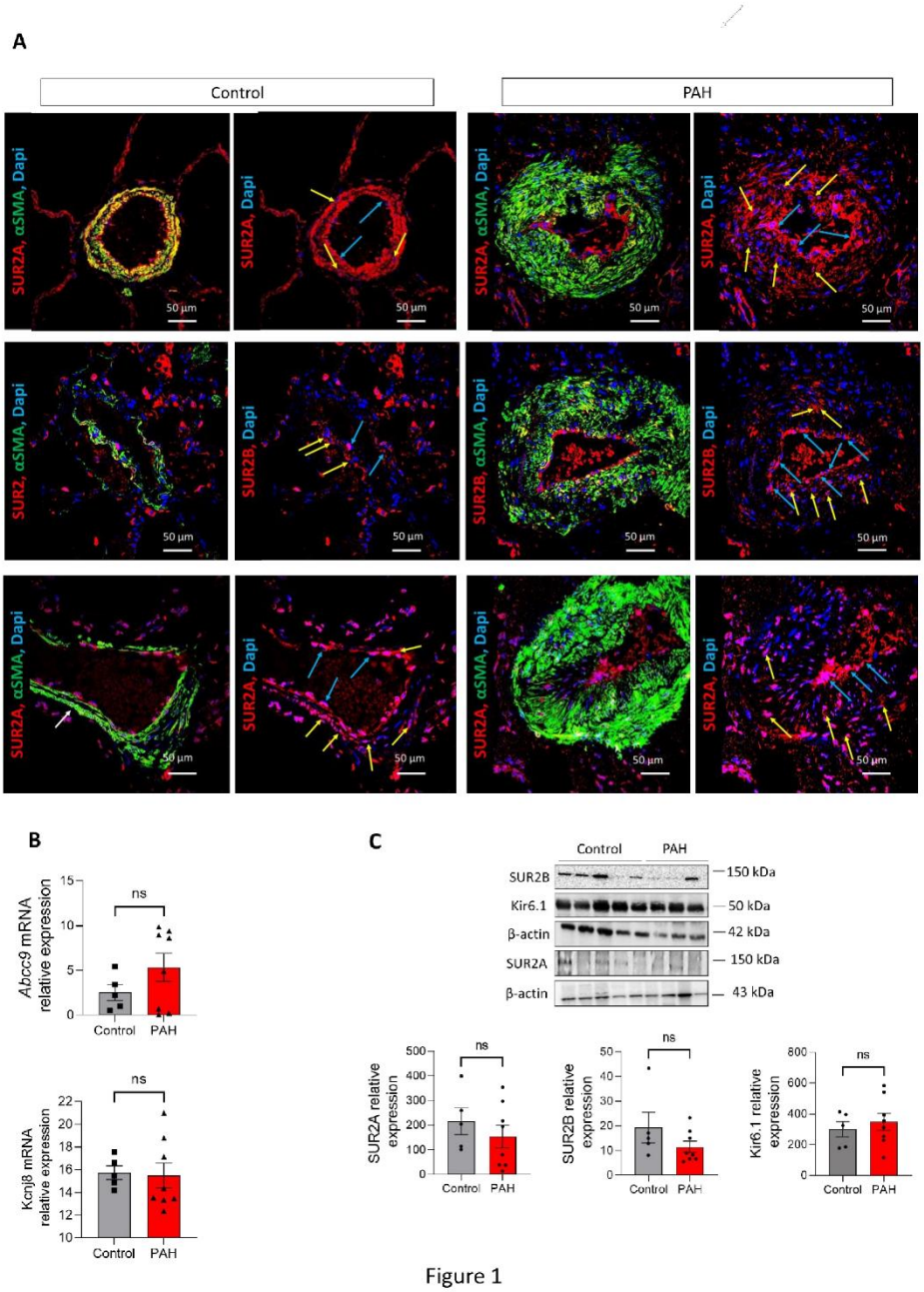


Figure 1

Figure 1: Expression of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 protein in lung from control and PAH patients. (A) SUR2A, SUR2B, or Kir6.1 immunostaining in paraffin-embedded lung sections from control and PAH patients; PAEC (blue arrow) and PASMC (yellow arrow) staining is visible. Scale Bar 50 µm. mRNA expression and representative Western blots of ABCC9 (coding for SUR2A and SUR2B) and KCNJ8 (coding for Kir6.1) in lung from control and PAH patients. (B and C, respectively) (n=9–12). ns:: non-significant vs. control. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

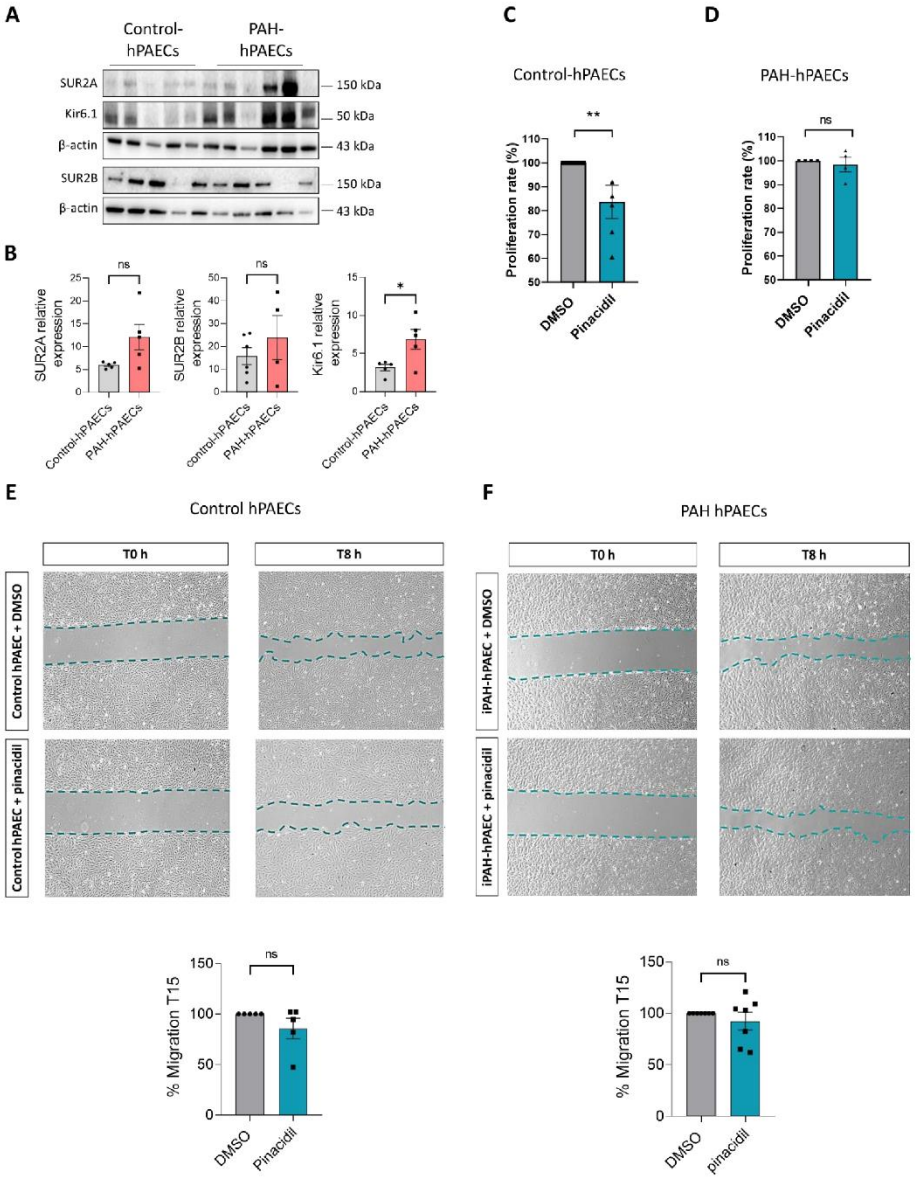


Figure 2

Figure 2: **SUR2/Kir6.1 channel pharmacological activation reduced the proliferation in control hPAECs.** (A) Representative Western blots of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in hPAECs in lung from

control and PAH patients. Quantification of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 expression in hPAECs from control and PAH patients (n=4-6). (C-D) Analysis by BrdU assay of the proliferation rate of hPAECs from control and PAH patients treated with pinacidil (10 µmol/L) or DMSO (n = 4-5 patients). (E-F) Analysis by the migratory capacity of hPAECs from control and PAH patients treated with pinacidil (10 µmol/L) or DMSO. (n = 5-7 patients). ns: non-significant. *$p<0.05$ **$p<0.001$. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

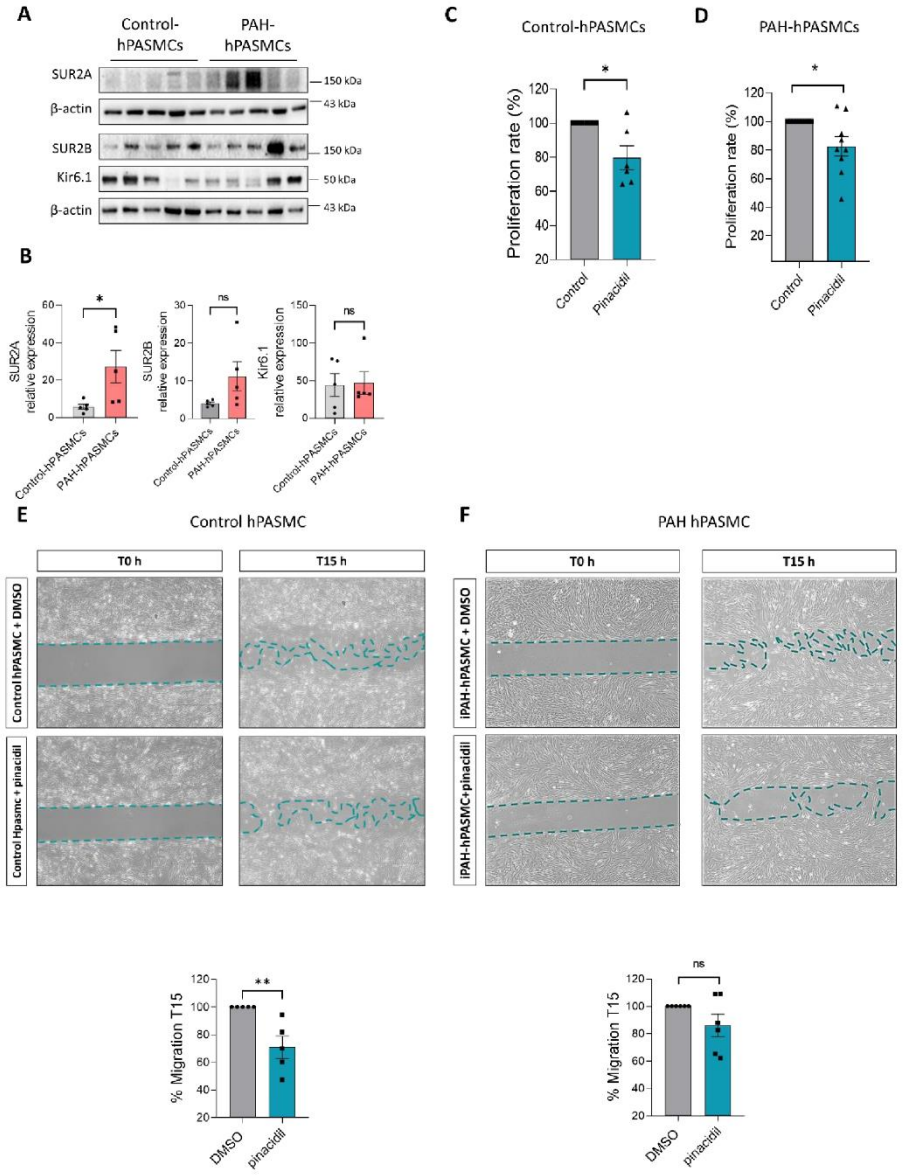


Figure 3

Figure 3: **SUR2/Kir6.1 channel pharmacological activation reduced the proliferation and migration of control and PAH-hPASMCs.** (A) Representative Western blots (A) and quantification (B) of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in hPASMCs from control and PAH patients (n=5). Analysis by BrdU assay of the proliferation rate of hPASMCs from control (C) and PAH patients (D) treated with

pinacidil (10 µmol/L) or DMSO (n=6-7 patients). (E-F) Analysis by the migratory capacity of hPASMCs from control (E) and PAH patients (F) treated with pinacidil (10 µmol/L) or DMSO (n = 5-6 patients). ns: non-significant. *$p<0.05$ **$p<0.001$. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

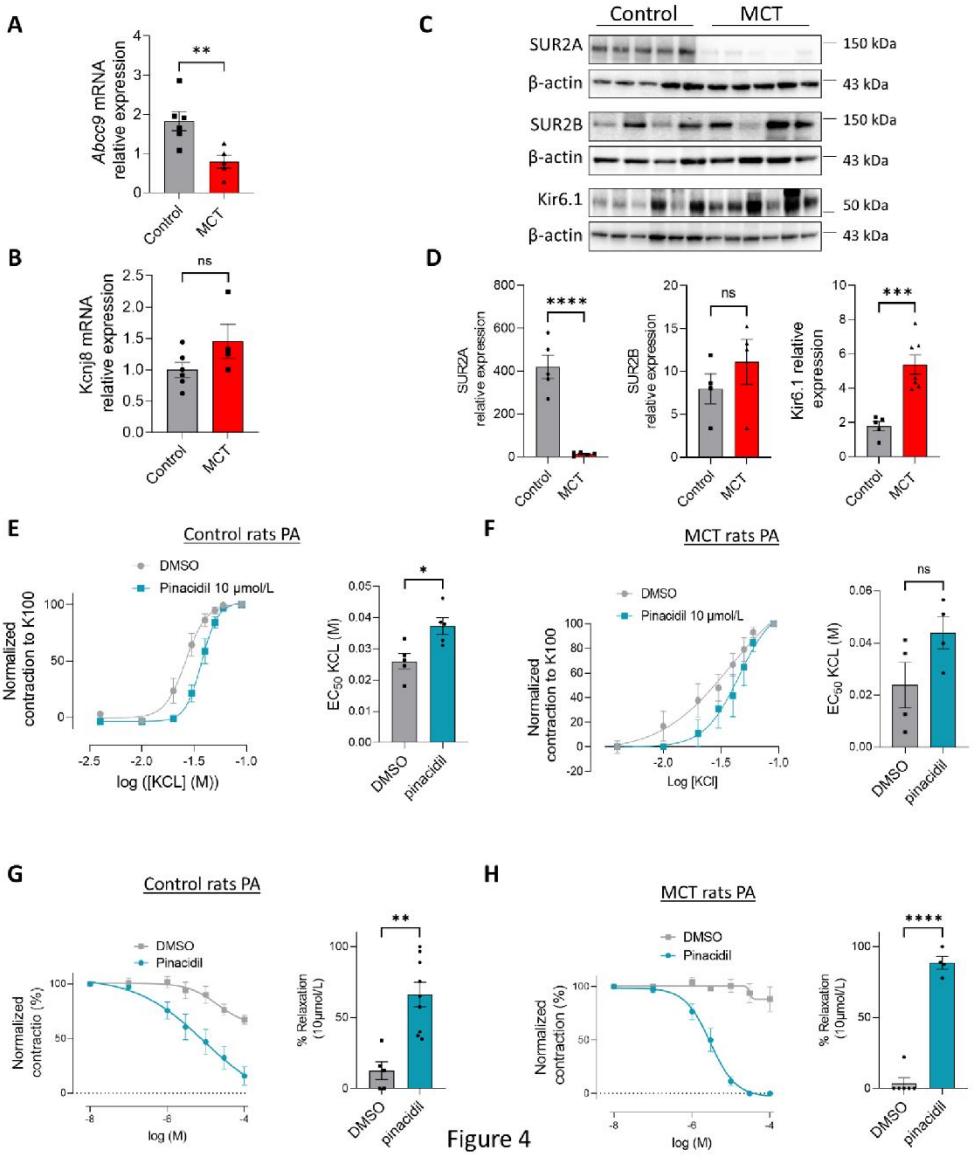


Figure 4

Figure 4: **Pharmacological activation of SUR2 produces PA relaxation in control and MCT-PH rats.** (A-B) Abcc9 and Kcnj8 mRNA expression was quantified in lungs from control and MCT-PH rats

(n=4-6). (C) Representative Western blots of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in lungs from control and MCT-PH rats (3 weeks). (D) Quantification of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 expression in lungs from control and MCT- rats (n=4-6). (E) Dose-response curve (normalized to K100) was established by increasing concentrations of KCl to isolated PA from control rats in the presence of DMSO or pinacidil (SUR2 activator, at 10 µmol/L). Corresponding quantification EC50 values (n=5 rats). (F) Dose-response curve (normalized to K100) was established by increasing concentrations of KCl to isolated PA from control and MCT-PH rats in the presence of pinacidil at 10 µmol/L. Corresponding quantification EC50 values (n=4 rats). (G) Dose-response to pinacidil (100 nmol/L to 100µmol/L) and DMSO on precontracted control rat PA by 1 µmol/L of U46619. Graphics represent the contraction percentage at 10 µmol/L of PA treated with pinacidil or DMSO (n =5-9 rats). (H) Dose-response to pinacidil (100 nmol/L to 100µmol/L) and DMSO on precontracted MCT-PH rat PA by 1 µmol/L of U46619 (n=4-5 rats). Graphics represent the contraction percentage at 10 µmol/L of PA treated with pinacidil or DMSO. ns: non-significant. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

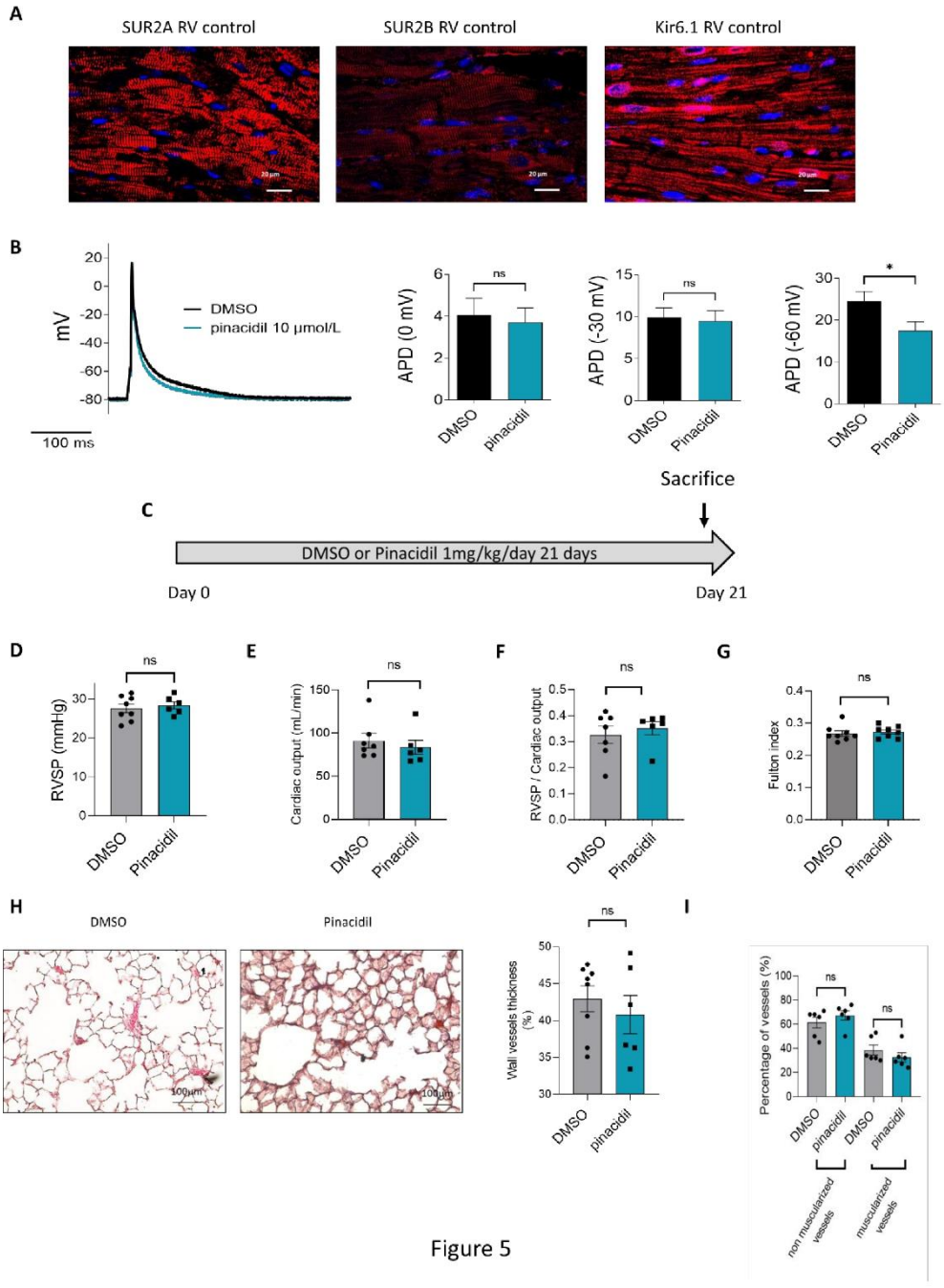

A
SUR2A RV control
SUR2B RV control
Kir6.1 RV control
B
mV
DMSO
pinacidil 10 µmol/L
100 ms
APD (0 mV)
APD (-30 mV)
APD (-60 mV)
ns
*
DMSO
pinacidil
Pinacidil
Sacrifice
C
DMSO or Pinacidil 1mg/kg/day 21 days
Day 0
Day 21
D
RVSP (mmHg)
E
Cardiac output (mL/min)
F
RVSP / Cardiac output
G
Fulton index
H
DMSO
Pinacidil
Wall vessels thickness (%)
I
Percentage of vessels (%)
non muscularized vessels
muscularized vessels

Figure 5

Figure 5: Consequences of SUR2 pharmacological activation in the RV compartment (in vitro and in vivo). (A) SUR2A, SUR2B, or Kir6.1 immunostaining in paraffin-embedded RV sections from control and MCT-PH rats. Scale Bar 50 µm. (B) Representative action potential in RV cardiomyocytes isolated from control rat in DMSO or after perfusion of pinacidil. Analysis of action potential duration at 0 mV, at –30 mV, and–60 mV of membrane repolarization in basal conditions and the presence of 10µmol/L of pinacidil (12–14 cells from four different rats). (C) *In vivo* experimental design. Pinacidil (1 mg/kg/day for 3 weeks) was administered long-term to healthy control rats by intraperitoneal injection. (D) RVSP (mmHg; n=6-8 rats per condition). (E) CO (mL/min) (n=6-8 rats per condition). (F) PVR (n=5 rats per condition) (G) and Fulton index (n=6-8 rats per condition). (H) Pulmonary vessel occlusion (%) was analyzed by hematoxylin-eosin Safran staining (HES) (n = 6-8 rats per condition). (I) Percentage of non-muscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat, (n=6-8 rats) as measured by immunostaining against α-smooth muscle actin (αSMA) and Von Willebrand Factor (VWF). ns: non-significant. *$p<0.05$ Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups. Differences between the three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

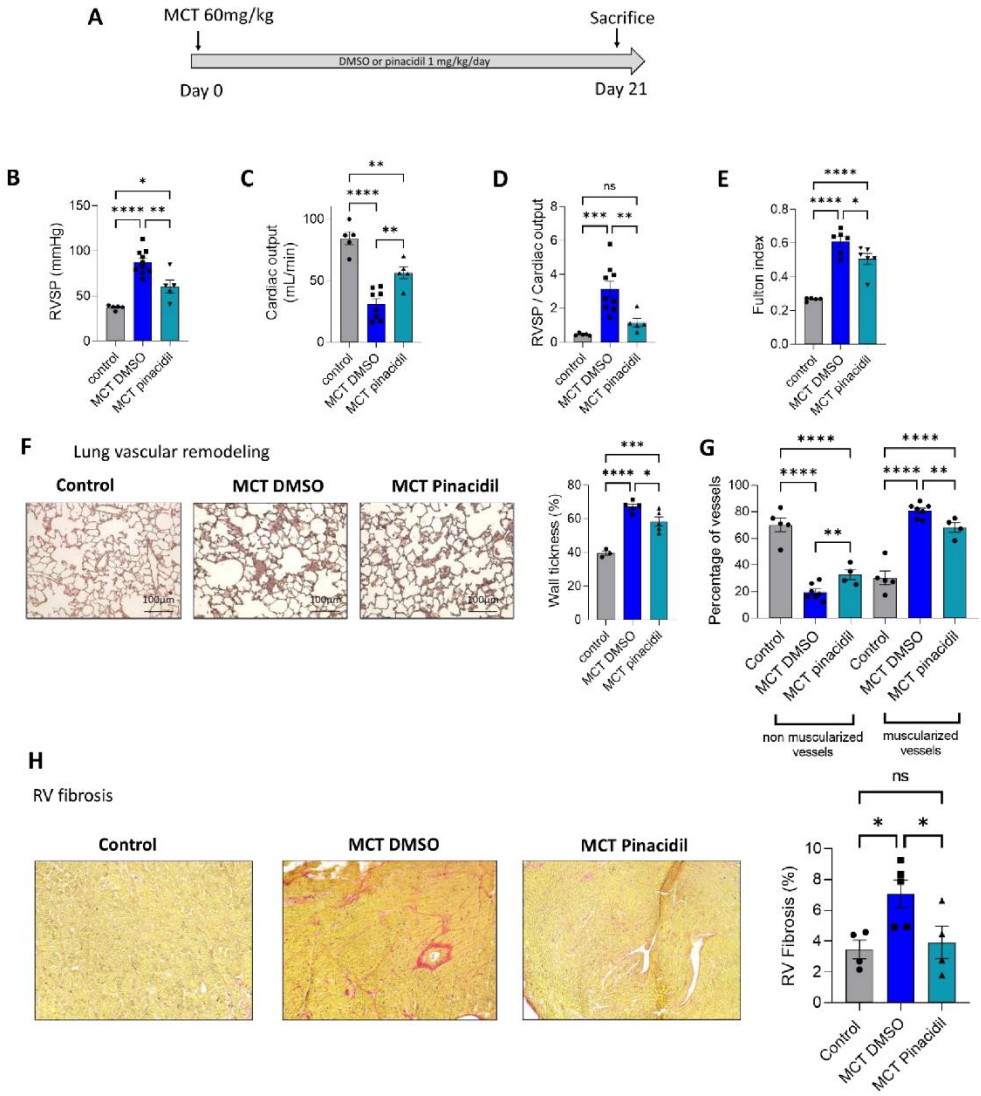


Figure 6

Figure 6: In vivo long-term pinacidil treatment interferes with MCT-PH development. (A) *In vivo* experimental design. Pinacidil (1 mg/kg/day for 3 weeks) was administered long-term during MCT exposure by intraperitoneal injection. (B) RVSP(mm Hg; n=5–10 different rats per condition) (C), Cardiac output (CO; mL/min) (n=5–8 different rats per condition). (D) PVR (evaluated by the RVSP/CO

ratio) (n=5-8 different rats per condition). (E) Fulton index (RV/LV+septum) (n=6 different rats per condition). (F) Pulmonary vessel occlusion (%) was analyzed by HES (n = 3-5 rats per condition). (G) Percentage of non-muscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat, (n=4-7 rats) as measured by immunostaining against α-smooth muscle actin (αSMA) and Von Willebrand Factor (VWF). (H) Interstitial fibrosis was analyzed with Sirius red staining in the RV compartment from control, MCT + DMSO, and MCT + pinacidil rats. Quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue in each condition (n = 20 images per rat from 4-5 different rats). ns: non-significant, *P<0.05 **P<0.01***P<0.001, ****P<0.0001. Differences between the three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

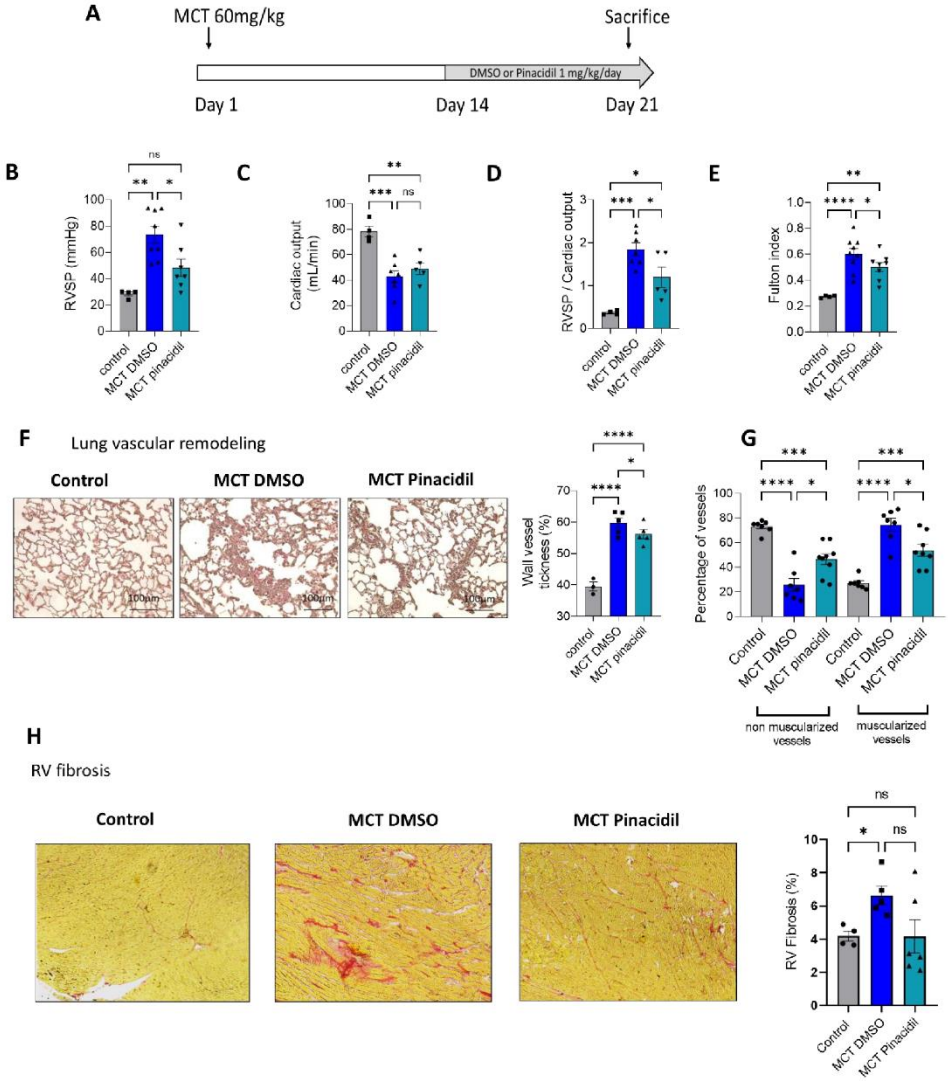


Figure 7

Figure 7: In vivo curative pinacidil treatment reduces the development of PH in MCT-PH rats. (A) *In vivo* experimental design. Pinacidil (1 mg/kg/day for day 14 to day 21) was administered short-term during MCT exposure by intraperitoneal injection. (B) RVSP (mm Hg; n=4-8 different rats per condition) (C), Cardiac output (CO; mL/min) (n=4-7 different rats per condition). (D) PVR (evaluated by the RVSP/CO ratio) (n=4-7 different rats per condition). (E) Fulton index (RV/LV+septum) (n=4–8 different rats per condition). (F) Pulmonary vessel occlusion (%) was analyzed by HES (n = 3-5 rats per

condition). (G) Percentage of non-muscularized and muscularized vessels (100 vessels per rat, (n=6-8 rats) as measured by immunostaining against αSMA and VWF. (H) Interstitial fibrosis was identified with Sirius red staining in the RV compartment from control, MCT + DMSO, and MCT + pinacidil rats. Quantification of the percentage of fibrosis in RV tissue in each condition (n = 20 images per rat from 4-5 different rats). ns: non-significant, *P<0.05 **P<0.01***P<0.001, ****P<0.0001. Differences between the three groups were assessed with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses.

Involvement of SUR2/Kir6.1 in the physiopathology of pulmonary arterial hypertension

Short title: SUR2/Kir6.1 in PAH

Hélène Le Ribeuz[1,2], Bastien Masson[1,2], Mary Dutheil[1,2,3], Angèle Boët[1,2], Antoine Beauvais[1,2], Vincent Thomas De Montpreville[4] Véronique Capuano[1,2,3], Olaf Mercier[5], Marc Humbert[1,2,6] David Montani[1,2,6] and Fabrice Antigny[1,2]

[1]*Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France (H.L-R, M.D, A.B, V.C, M.H, D.M, and F.A)*

[2]*INSERM UMR_S 999 « Hypertension pulmonaire : Physiopathologie et Innovation Thérapeutique », Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France (H.L-R, M.D, A.B, V.C, M.H, D.M, and F.A)*

[3]*Hôptal Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph, Le Plessis Robinson, France (M.D, V.C)*

[4]*Department of Pathology, Groupe Hospitalier-Marie Lannelongue, 92350 Le Plessis-Robinson, France (V.D-M)*

[5]*Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardio-Pulmonaire, Hôpital Marie Lannelongue, Groupe Hospitalier Paris Saint Joseph, Le Plessis Robinson, France. (O.M)*

[6]*Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France. (M.H, D.M)*

Corresponding author: Fabrice Antigny, INSERM UMR_S 999, Hôpital Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. Tel.: (33) 1 40 94 22 99, e-mail: fabrice.antigny@inserm.fr

Materials and methods

Patients: Human lung specimens were obtained at lung transplantation in 7 patients with PAH and upon lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from 10 control subjects. PAs were isolated away from tumour areas in the lung specimens from control subjects. Transthoracic echocardiography was performed preoperatively in the control subjects to rule out PH [1].

The patients studied were part of the French Network on Pulmonary Hypertension, a programme approved by our institutional Ethics Committee, and had signed informed consent forms (Protocol N8CO-08- 003, ID RCB: 2008-A00485-50, approved on June 18, 2008). All human tissues were obtained with signed informed consent from transplant recipients or families of organ donors in accordance with the Declaration of Helsinki.

Human PASMC and PAEC culture- Human lung specimens were obtained from a lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer from control subjects. PAs were excised at a distance from tumour areas. hPAECs and hPASMCs were cultured as previously described [2,3] and were used for the study at passages 4-5. Patients studied were part of a program approved by the institutional Ethics Committee and had given written informed consent (ID RCB: 2018-A01252-53, approved on June 18, 2006).

Pulmonary vascular cells proliferation measurement- To evaluate cell proliferation, we quantified BrdU incorporation in a cell undergoing DNA replication using a DELFIA cell proliferation kit (AD0200, PerkinElmer). Experiments were performed according to the kit recommendations. To evaluate the proliferation state of the cells, different treatments were used: hPASMCs and hPAECs from control and PAH subjects were treated 24 hours with pinacidil (10 µmol/L) or the same amount of DMSO. To stimulate the cell proliferation, the medium contained 10 percent of FBS + EGF + insulin in the presence of 1 µmol/L BrdU for 24 h (Perkin Elmer). The fluorescence signal in the 96-well plate was read with an Envision 2103 plate reader (Perkin Elmer).

Animals and surgical procedures: The animal facility is licenced by the French Ministry of Agriculture (agreement N°C92-019-01). This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments (CEEA26 CAP Sud). The animal experiments were performed in compliance with the guidelines from Directive 2010/63/EU on 22 September 2010 of the European Parliament on the

protection of animals used for scientific purposes and complied with the French institution's guidelines for animal care and handling.

In vivo experiments performed in the study were performed according to clinical trial standards: rats were randomly distributed between groups, and all methods and analyses were performed blinded to the conditions. All rats received a number known by only the experimenter who administered the treatment to rats. Before euthanasia (day 21), all rats underwent an evaluation with closed-chest right heart catheterization. This experiment was performed by a blinded experimenter who did not know the correspondence between ID and treatment. Haemodynamic parameters were analysed blind.

Male Wistar rats (4 weeks old) were used in four experimental protocols:

1. PH was induced by a single MCT injection (60 mg/kg, s.c.). MCT was dissolved in 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH. Control animals received the same volume of saline solution.

2. For the pinacidil-exposed rats, Wistar rats were treated with pinacidil (1 mg/kg/day in DMSO, daily intraperitoneal injection) from days 0 to day 21. Pinacidil was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

3. MCT-exposed Wistar rats were treated with pinacidil (1 mg/kg/day in DMSO, daily intraperitoneal injection) from days 14 to 21 in a short and late protocol and from days 0 to day 21 with a chronic protocol. Pinacidil was dissolved in DMSO. Control animals received the same volume of DMSO.

Chemicals: MCT and pinacidil were obtained from Sigma. U46619 was obtained from R&D Systems.

Western blot analyses: Total protein from human or rat lungs or isolated PA tissue samples were prepared as described previously[4]. The list of antibodies used is presented in Supplemental Table 1.

Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR): Total RNA was extracted using TRIzol according to standard protocols. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA; cat. no. 205311). Gene expression was quantified using qPCR following the standard protocol for ready-to-use TaqMan gene expression assays (Life Technologies) on a StepOne Plus Real-Time PCR System (Life Technologies). Predesigned probe sets used for experiments are described in Supplemental Table 2.

Haemodynamic measurements and collection of tissues: Rats were placed under general anaesthesia and spontaneous breathing with an isoflurane Rodent Anaesthesia System (Minerve Esternay, France)

(maintenance: isoflurane 2% at room air). Haemodynamic measurements, such as right ventricular systolic pressure (RVSP; mmHg), cardiac output (CO; ml/min), and mean carotid pressure (mCP; mmHg), were measured blindly in unventilated anaesthetized rats using a closed chest technique. After catheterization, tissues were collected, and Fulton's index, the ratio of RV weight to LV plus septal (S) weight (RV/LV+S), was calculated.

Isolation of adult rat ventricular myocytes- Male Wistar rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (0.1 mg/g). Hearts from control rats were mounted on a Langendorff apparatus and perfused through the coronary arteries with collagenase A (Roche, Meylan, France). The solution used to isolate myocytes was a Hanks-Hepes buffer solution containing (mM): NaCl, 117; KCl, 5.7; MgCl2, 1.7; KH2PO4, 1.5; NaHCO3, 4.4; HEPES, 21; glucose, 11.7; creatine, 10; taurine, 20; bubbled with 100% O2; pH 7-1. Digestion time varied between 40 min and 50 min. At the end of the enzymatic digestion, the right ventricles (RV) were excised, chopped finely, and agitated manually to dissociate individual myocytes.

Electrophysiological recordings- Borosilicate glass pipettes (Harvard Apparatus) were pulled with a Sutter puller, fired polished, and had a resistance between 1-2 MΩ. Series resistance was electronically compensated up to 50% and was continually monitored during the experiment. The composition of the standard extracellular solution used to record APs were (mM): NaCl, 140; KCl, 4; CaCl2, 1.8; MgCl2, 1.1; HEPES, 10; glucose, 10; pH 7.4 (LiOH). When APs were recorded the pipette solution contained (mM): KCl, 135; MgCl2, 4; Ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid (EGTA), 10; Glucose 10; HEPES, 10; Na2-ATP 5; Na2-CP 3, pH 7.2 (LiOH). Action potential were measured in a current-clamp configuration response to brief (1-2 ms) depolarizing current injections at 1 Hz as described [5]

Myograph experiments: Human PAs and rat PAs and or descending aorta were mounted in an emkaBATH4 modular tissue bath system (EMKA Technologies, Paris, France) coupled to IOX software (EMKA Technologies). As determined in preliminary experiments, rat PAs were set at 0.250 g and aorta at 1 g. For each condition using rat PAs, we used 7–10 PAs from 7–10 different animals in each condition. The PA internal diameter was between 150 and 250 µm.

Vessels were bathed in Krebs solution containing (in mmol/L) 119 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1.17 $MgSO_4$, 1.18 KH_2PO_4, 25 $NaHCO_3$, and 11 glucose at 37°C and continuously aerated with a mixture of CO_2/O_2 (5%/95%). Rat PAs were set at optimal length by equilibration against a passive load of 0.3 g. After adding Krebs solution again, vessels were contracted with 100 mmol/L K^+-containing solution (K100). Once a plateau was reached, the vessels were washed with Krebs solution for 30 min. DMSO pinacidil (10 µmol/L) were used as pretreatments before the dose-response to KCl (10–90 mmol/L). Pinacidil was used to induce relaxation by increasing concentration (1nmol/L to 100µmol/L) after vessel contraction, obtained using the thromboxane A2 analogue U46619 (1 µmol/L). All modified Krebs solutions prepared with various KCl concentrations (K10 to K100) had an equimolar substitution of NaCl to maintain constant osmolarity and [Cl^-] compared to standard Krebs solution. The contractile responses were expressed relative to the response to the K100 challenge. The relaxation responses were expressed as the percentage of the precontractile response obtained with U46619.

Echocardiographic measurement: Evaluation by trans-thoracic echocardiography (TTE) was performed with a digital ultrasound system (Vivid E9, GE Healthcare) using a high-frequency phased array transducer (12 S-D 4-12 MHz, GE Healthcare). The echocardiographic evaluation procedure was performed under general anaesthesia and spontaneous breathing with an Isoflurane Rodent Anaesthesia System (Minerve, Esternay, France) (maintenance isoflurane 2% at room air). Rats were shaved, and body temperature was controlled during experiments. All analyses were blinded: rats' experimental conditions were unknown by the operator during TTE examination and data interpretation. Measurement of pulmonary artery acceleration time (PAAT), heart rate (HR), and pulmonary artery velocity time integral (VTI) were performed as previously described[5]. In the 4-cavity view performed subcostally, we measured RV and LV thickness, RV or LV end-diastolic diameter (RV EDd, LV EDd, respectively), and systolic diameter (RV EDs, LV EDs). RV and LV fractional shortening (FS) correspond to the percentage change in LV and RV cavity diameters. LV FS (%) = (LV EDd-LV EDs/LV EDd) * 100 or RV FS (%) = (RV EDd -RV EDs/RV EDd) * 100.

Immunofluorescence staining: Frozen lungs were prepared as described previously[2]. Paraffin-embedded 5µm thick sections of lung samples were mounted on SuperFrostPlus slides (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France). Free aldehyde groups from PFA fixation were quenched for 10

minutes with 50 mM NH4Cl solution. Slices were saturated with human serum (10%) in PBS for 1 hour at room temperature. We used primary antibodies against SUR2A (1/100), SUR2B (1/100), or Kir6.1 (1/100) against α-Smooth Muscle Actin (α-SMA, Sigma, F3777) (1/200). Primary Antibody was detected with the secondary antibodies goat anti-mouse and goat anti-rabbit (1/400). Slides were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

Pulmonary vessels neovascularization was evaluated by immunostaining against alpha-SMA-FITC (SMC marker F3777 Sigma)/Von Willebrand Factor (endothelial marker, A0082 DAKO). Sections were viewed under a LSM 700 microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France). Images were recorded and analyzed with ZEN software (Carl Zeiss).

Wound healing assay: We used the wound healing assay to evaluate cell migration. After 48 h of starvation (medium without growth factors: FBS, EGF, and insulin), human PASMCs were plated in a culture insert (Cat. No. 90209; Ibidi) at a density of 1.2×10^4 cells per well in a fresh medium with cytosine arabinoside (10 µmol/L). After allowing cells to attach for 24 h, we removed the culture insert and washed the cells with phosphate-buffered saline to remove non-adherent cells. We added fresh medium with DMSO or pinacidil (at 10 µmol/L). We photographed the wound at time 0 and after 15 h for hPASMCs and between 0 and 8h for hPAECs (corresponding to approximatively 50% of wound recovery). Cell migration into the wound space was quantified using image J. Cell motility/invasion was assessed by the percentage of wound closure 15 h after initiation of wound healing ([(area T0 − area T15) ÷ area T15] × 100).

Pulmonary vessel remodelling analysis: The lungs were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and serially sectioned (5 µm). The histopathological evaluation of the lungs was performed by a pulmonary pathologist who was blinded to the rats' genotypes and treatment group assignments. The morphometric analyses were performed on sections stained with hematein-eosin-Safran (HES). The lung samples from all the conditions were analysed by conventional light microscopy using quantitative semiautomated software (NIS-BR; Nikon, Champigny sur Marne, France). Vascular remodelling was

assessed in all the pulmonary vessels larger than 50 µm and less than 100 µm that were identified in 20 randomly selected microscopic fields per tissue section. The wall thickness was calculated according to the following equation: (External diameter -Internal diameter) / (External diameter)) × 100.

Histological assessment on hearts: Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded, and serially sectioned (5 µm). Heart sections were stained with Sirius red (0.1%) to assess heart fibrosis. Pictures were recorded at 10X on an EVOS confocal (Carl Zeiss). RV fibrosis was quantified using Image J software.

Statistical analyses: All statistical tests were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, version 8.0 for Windows). All data were verified for normal distribution using the Shapiro-Wilk normality test. All values are reported as the mean ± SEM. For all experiments, the difference between two groups was assessed by two-tailed unpaired Student's t-tests. The differences between three groups were evaluated with one-way ANOVA completed by Tukey's multiple comparisons test for post hoc analyses. Differences were considered statistically significant at p-values <0.05.

References

1. Le Ribeuz H, To L, Ghigna M-R, Martin C, Nagaraj C, Dreano E, Rucker-Martin C, Girerd B, Bouliguan J, Pechoux C, Lambert M, Boet A, Issard J, Mercier O, Hoetzenecker K, Manoury B, Becq F, Burgel P-R, Cottart C-H, Olschewski A, Sermet-Gaudelus I, Perros F, Humbert M, Montani D, Antigny F. Involvement of CFTR in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2021.

2. Lambert M, Capuano V, Boet A, Tesson L, Bertero T, Nakhleh MK, Remy S, Anegon I, Pechoux C, Hautefort A, Rucker-Martin C, Manoury B, Domergue V, Mercier O, Girerd B, Montani D, Perros F, Humbert M, Antigny F. Characterization of *Kcnk3* -Mutated Rat, a Novel Model of Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 2019;**125**:678–695.

3. Le Ribeuz H, Dumont F, Ruellou G, Lambert M, Balliau T, Quatredeniers M, Girerd B, Cohen-Kaminsky S, Mercier O, Yen-Nicolaÿ S, Humbert M, Montani D, Capuano V, Antigny F. Proteomic Analysis of KCNK3 Loss of Expression Identified Dysregulated Pathways in Pulmonary Vascular Cells. *Int J Mol Sci* 2020;**21**.

4. Le Ribeuz H, Masson B, Capuano V, Dutheil M, Gooroochurn H, Boët A, Ghigna M-R, De Montpreville V, Girerd B, Lambert M, Mercier O, Chung WK, Humbert M, Montani D, Antigny F. SUR1 as a New Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2022.

5. Lambert M, Boet A, Rucker-Martin C, Mendes-Ferreira P, Capuano V, Hatem S, Adão R, Brás-Silva C, Hautefort A, Michel J-B, Dorfmuller P, Fadel E, Kotsimbos T, Price L, Jourdon P, Montani D,

Humbert M, Perros F, Antigny F. Loss of KCNK3 is a hallmark of RV hypertrophy/dysfunction associated with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2018;**114**:880–893.

Supplemental tables

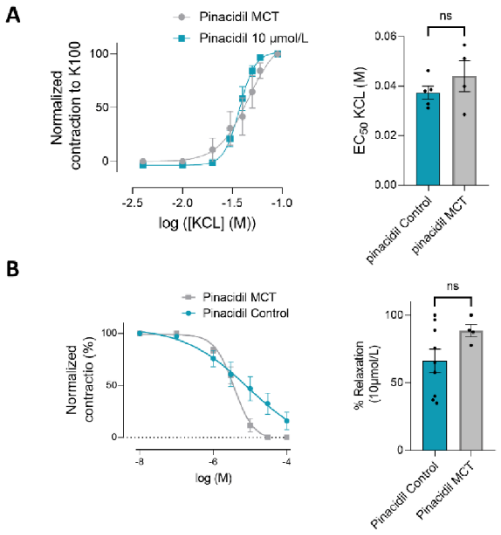
Table E1: Antibodies used for western blotting and Immunofluorescence

Antibody	Species	Dilution WB	Dilution IF	Suplier	Reference
KIR6.1	Rabbit	1/1000	1/100	Alomone labs	APC-105
SUR2A	Rabbit	1/1000	1/100	Novus biologicals	NBP1-59350
SUR2B	Mouse	1/1000	x	Neuromab	Q63563-2)
SUR2B	Mouse	x	1/100	sigma	MABN511
β-actin-HRP	Mouse	1/2000	x	Santa cruz	sc-47778
α-SMA-FITC	Mouse	x	1/200	sigma	A2547
VWF	Rabbit	x	1/200	dako	A0082

Table E2: Primers used for RT-qPCR

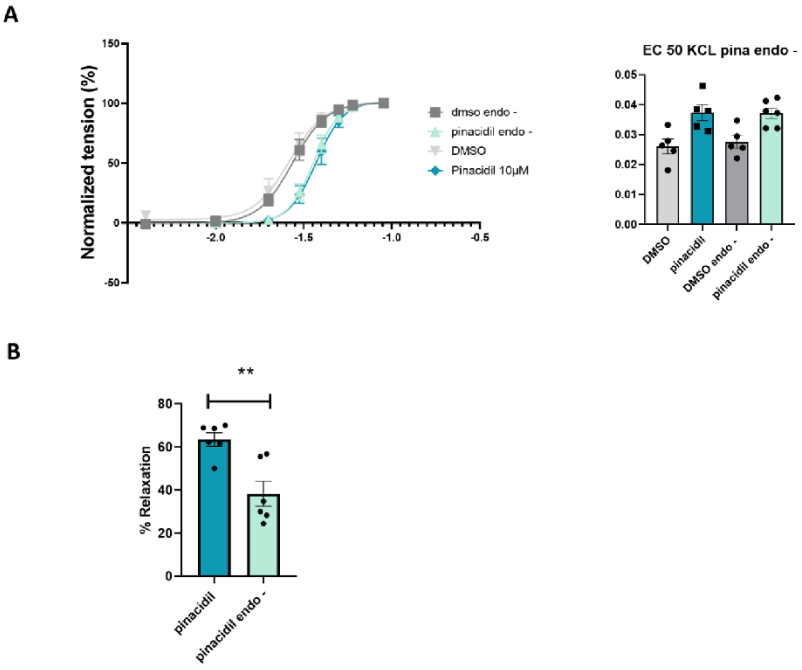
Gene	Primer reference (Applied Biosystem)	Species
18S	Hs03003631_g1	Human
ABCC9	Hs00245832_m1	Human
ABCC9	Rn00564842_m1	Rat
KCNJ8	Hs00958961_m1	Human
KCNJ8	Rn01492857_m1	Rat

Supplemental figure legends



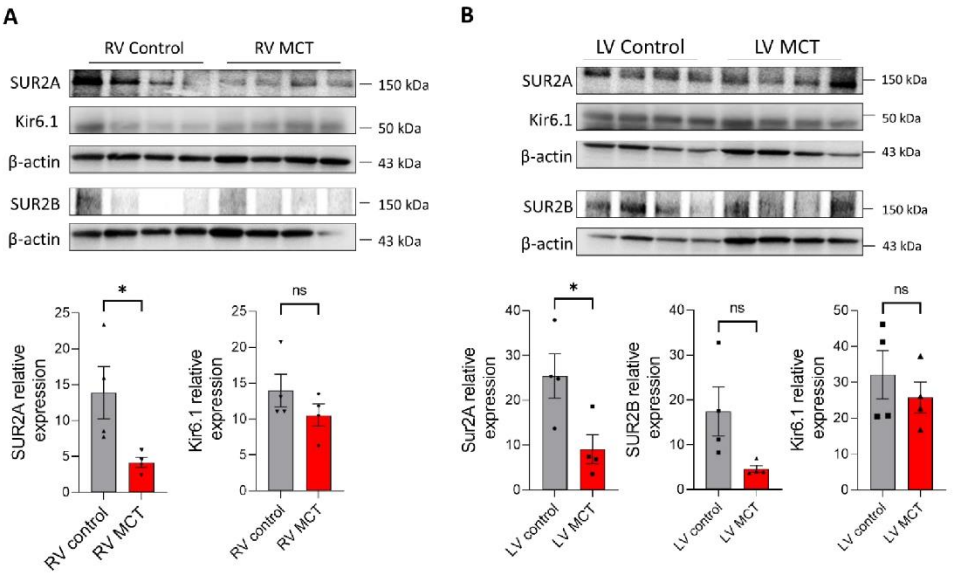
Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1: **Consequence of pinacidil application on pulmonary arterial tone.** (A) Dose-response curve (normalized to K100) was established by applying increasing concentrations of KCl to isolated PAs from control and MCT rats in the presence of pinacidil at 10 µmol/L) Corresponding quantification of Hillslope and EC50 values (n=4-5 rats). (B) Dose-response to pinacidil (100 nmol/L to 100µmol/L) on precontracted control and MCT rat PA by 1 µmol/L of U46619. Graphics represent the contraction percentage at 10 µmol/L of PA of control or MCT RATS treated with pinacidil (n =5-9 rats). ns: non-significant. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.



Supplemental Figure 2

Supplemental Figure 2: **Pinacidil mediated pulmonary artery relaxation in the absence of pulmonary endothelium** (A) Concentration-response curve (normalized to K100) established by applying increasing concentrations of K^+ on PA isolated from control rats with (endo+) or without (endo -) endothelium and treated with pinacidil at 10µmol/L or DMSO (n = 5-6 patients for each condition). Patients (B) Quantification of pinacidil mediated PA relaxation with (endo +) or without pulmonary endothelium (endo -) (n=7 rats). ns: non-significant. $^{**}P<0.01$. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.



Supplemental Figure 3

Supplemental Figure 3: SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 protein expression in RV and LV compartments. (A) Representative Western blots of SUR2A, SUR2B1, and Kir6.1 in RV from control and MCT-PH rats (3 weeks), and quantification of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 expression in RV from control and MCT-PH rats (n=5-8). (B) Representative Western blots of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in LV from control and MCT-PH rats (3 weeks), and quantification of SUR2A, SUR2B, and Kir6.1 in LV from control and MCT-PH rats (n=4-). ns = non-significant; *P< 0.05 control. Two-tailed unpaired Student's t-tests assessed the difference between the two groups.

Conclusion générale

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardio-pulmonaire rare et sévère qui s'initie par l'obstruction progressive des artères pulmonaires de petit calibre (<500µm). Cette obstruction est dûe à un remodelage progressif de la paroi vasculaire et une vasoconstriction anormale des APs. Ce remodelage résulte de la dysfonction des CE-APs et CML-APs dont plusieurs processus cellulaires et moléculaires vont être altérés comme la balance prolifération/apoptose, la migration, la contraction, l'inflammation...Tout ceci conduit à une augmentation des pressions vasculaires pulmonaires, une hypertrophie du ventricule droit puis à terme à une défaillance cardiaque.

Une vingtaine de gènes ont été identifié comme muté chez des patients atteints d'HTAP et deux de ces gènes codent pour un canal potassique. Il s'agit de KCNK3 et ABCC8.

Pour KCNK3 c'est depuis 2013 que des mutations ont été découvertes et depuis plusieurs études ont mis en évidence que ces mutations entrainaient une perte de fonction du canal et que cette perte de fonction est un marqueur de l'HTAP, retrouvé chez des patients atteints d'HTAPi ou HTAPh ainsi que dans plusieurs modèles animaux d'HTP. Durant ma thèse, j'ai voulu comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impactés par une perte d'expression et de fonction de KCNK3. Par une analyse de protéomique sur des CML-APs et CE-APs contrôles transfectées avec un siKCNK3 ou un siContrôle j'ai pu mettre en évidence que la perte de KNCK3 entrainait notamment dans ces cellules une activation des voies de survie cellulaire et de migration/invasion cellulaire ainsi que l'activation de voies en réponse à divers stress comme le stress métabolique ou oxydant. D'autre part nous avons également observé une altération des voies de l'apoptose ainsi que des voies de réponse à une infection virale. Cette étude a permis de confirmer l'implication de KCNK3 dans la dérégulation de certaines voies déjà connues pour être impliquées dans la pathogenèse de l'HTAP ainsi que de découvrir l'implication de nouvelles voies qui semblent pouvoir jouer un rôle dans le développement de la maladie.

C'est en 2018 que des mutations dans le gène *ABCC8* ont été découvertes chez des patients atteints d'HTAP. *ABCC8* code pour la protéine SUR1, sous unité régulatrice du canal potassique KATP, SUR1/Kir6.2. L'analyse de ces mutations démontre une perte de fonction du canal.

Durant ma thèse, je me suis intéressée au rôle de ce canal dans la physiopathologie de l'HTAP et nous avons mis en évidence que SUR1/Kir6.2 était bien exprimé dans le tissu vasculaire pulmonaire des patients contrôles, mais aussi des patients atteints d'HTAP. J'ai également démontré *in vitro* que l'activation de SUR1 avec le diazoxide permettait de réduire la prolifération des CML-APs et CE-APs contrôles. Par des expériences de myographe j'ai mis en évidence l'implication de ce canal dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire chez le rat et l'homme. Pour finir, l'activation du canal *in vivo* dans deux modèles animaux (MCT et hypoxie chronique) permet d'atténuer le développement de la maladie ce qui suggère que SUR1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans l'HTAP.

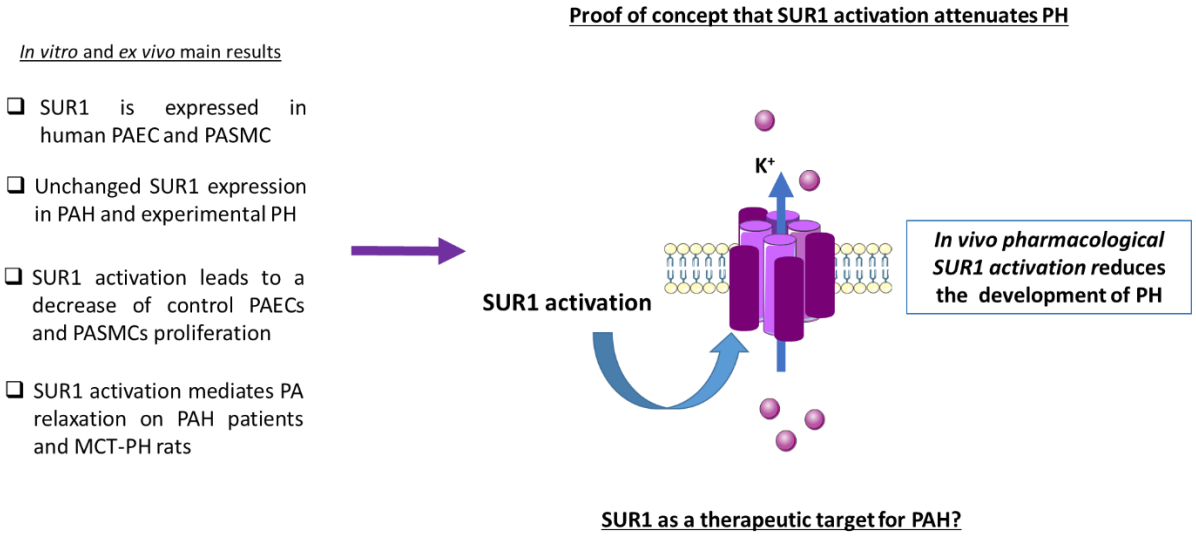


Figure 43 Schéma récapitulatif du rôle de SUR1 dans la physiopathologie de l'HTAP

La famille des KATP comprend également un autre canal, SUR2/Kir6.1. SUR2 présente une grande homologie avec SUR1, mais présente néanmoins des propriétés et une expression différente. C'est pourquoi, durant ma thèse j'ai également voulu étudier le canal SUR2/Kir6.1, afin de déterminer s'il contribue au développement de l'HTAP. Nous avons pu démontrer que ce canal est bien présent dans les cellules vasculaires pulmonaires et que son expression n'est pas perdue chez les patients atteints d'HTAP. J'ai montré que l'activation de SUR2 avec le pinacidil entraine une diminution de la prolifération des CE-APs et CML-APs contrôles ainsi qu'une diminution de la capacité migratoire des CML-APs contrôles. *Ex vivo*, l'activation de SUR2 induit également une forte relaxation des APs de rats contrôles et MCT. Enfin *in vivo*, l'activation de SUR2 avec le pinacidil dans le modèle de rat MCT a entrainé l'amélioration des

pressions systoliques du ventricule droit ainsi que le remodelage vasculaire pulmonaire. Toute cette étude permet de conclure que le canal SUR2/Kir6.1 joue bien un rôle dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire et que son activation peut atténuer le développement de l'HTAP.

Plus globalement les KATP sont des cibles intéressantes pour le traitement de l'HTAP, car nous avons mis en évidence que leur expression n'est pas altérée dans l'HTAP comparé à d'autres canaux potassiques comme KCNK3 par exemple.

Perspectives

Concernant le projet sur l'analyse protéomique de la perte de KCNK3 dans les cellules vasculaires pulmonaires, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs fonctions biologiques étaient dérégulées et notamment certaines sont déjà connues dans l'HTAP comme la prolifération, la résistance a l'apoptose, la migration, l'inflammation...Néanmoins d'autres voies ont également été mises en évidence telles que la voie NRF2 impliquée dans le stress oxydant, la voie des interférons impliquée dans la réponse immunitaire, la voie de dégradation de la méthionine...

Nous aimerions par la suite regarder dans les CML-APs et CE-APs si ces grandes voies biologiques dérégulées sont bien altérées avec la perte de KCNK3. Au laboratoire il avait déjà été mis en évidence une augmentation de la prolifération des CML-APs transfectées avec le siKCNK3(Lambert et al. 2019). De plus, nous aimerions analyser d'autres processus biologiques comme la migration et l'apoptose dans les CML-APs et CE-APs transfectées avec le siKCNK3. De plus, l'analyse protéomique a révélé que la perte de KCNK3 pouvait activer la voie de la glycolyse par la réduction d'expression du G6PD. Nous pourrions analyser la production d'ATP des CML-APs et CE-APs siKCNK3 afin de déterminer s'il y a un switch de production d'ATP vers la glycolyse. De plus, l'analyse protéomique a également mis en évidence une diminution de plusieurs IFIT, exprimés lors d'une infection virale, ainsi que l'altération d'expression de plusieurs cytokines. Nous pourrions doser l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines produites par les CML-APs et CE-APs transfectées avec le siKCNK3 afin de mettre en évidence comment la perte de KCNK3 peut elle induire un processus inflammatoire.

Après la découverte de mutations *KCNK3* chez des patients atteints d'HTAP, plusieurs études du laboratoire ont mis en évidence que la perte d'expression et de fonction de KCNK3 était un marqueur de la maladie et que cette dysfonction est retrouvée dans plusieurs groupes d'HTAP ainsi que dans les modèles animaux d'HTP. C'est pourquoi la réexpression de KCNK3 pourrait être une thérapie intéressante. La thérapie génique est un outil de plus en plus testé en laboratoire et le nombre d'essais cliniques avec cette technologie est en forte hausse, notamment pour le traitement des cancers et des maladies cardiovasculaires. Pour réexprimer KCNK3 nous pourrions utiliser un virus adéno associé (AAV) contenant l'ADN de KCNK3 et

l'adiministrer à des modèles de rats HTP afin d'analyser si la réexpression de KCNK3 peut permettre de réduire le développement de la maladie.

Nos études sur les canaux KATP SUR1/Kir6.2 et SUR2/Kir6.1 ont permis de révéler le rôle de ces canaux sur le tonus vasculaire pulmonaire ainsi que sur la prolifération des CML-APs et CE-APs et qu'ils pouvaient être des cibles intéressantes dans l'HTAP. Néanmoins nous n'avons pas étudié les mécanismes moléculaires qui peuvent être liés à l'activation de ces canaux. Il serait intéressant de regarder si l'activation des canaux par le diazoxide ou le pinacidil a un impact sur les voies de prolifération cellulaire comme la voie des MAPkinases et voie PI3K/Akt. Nous pourrions par western blot analyser l'expression de ces voies dans des cellules traitées avec le diazoxide ou le pinacidil. De plus, nous pourrions également mesurer l'expression de protéines impliquées dans les voies d'apoptose, de migration ou d'angiogenèse afin de comprendre quelles sont les fonctions biologiques régulées par ces canaux.

De plus, les canaux KATP sont connus pour être sensibles à l'ATP intracellulaire. En effet, une augmentation de production d'ATP par la cellule a pour impact la fermeture de ces canaux. Dans l'HTAP, il a déjà été démontré qu'il y a une altération de la production d'ATP mitochondriale ce qui entraine une augmentation de production d'ATP par la voie de la glycolyse. Il serait intéressant de regarder la production d'ATP de CML-APs et CE-APs HTAP et contrôles traitées avec du diazoxide et pinacidil.

De plus, nous savons que SUR1 s'associe majoritairement avec Kir6.2 et que SUR2 s'associe plutôt avec Kir6.1, néanmoins il est connu que chacun des SUR peut réguler les deux canaux Kir. Il serait intéressant de regarder au niveau des cellules vasculaires pulmonaires les associations possibles par des expériences de co-immunoprécipitation. Nous pourrions également voir si SUR1 s'associe avec le canal cationique TRPM4 comme il a été démontré au niveau cérébral(Woo et al. 2020). Pendant ma thèse, j'ai pu démontrer que TRPM4 était bien exprimé dans les poumons de patients contrôles et de patients atteints d'HTAP ainsi que dans les modèles animaux d'HTP, néanmoins nous ne savons pas si dans les CML-APs et CE-APs il se co-assemble avec SUR1 et si le diazoxide peut entrainer son activation.

Par des expériences de myographe, j'ai mis en évidence que l'activation de SUR1 et de SUR2 sur des APs de rats contrôles et MCT entrainait une relaxation importante. De plus, l'activation

de ces canaux par le diazoxide ou le pinacidil *in vivo*, dans le modèle de rat MCT entrainait la réduction du développement de l'HTP. C'est pourquoi il serait intéressant d'activer *in vivo* à la fois SUR1 et SUR2 en traitant des rats MCT au diazoxide et au pinacidil afin d'analyser si leurs effets peuvent s'additionner et entrainer une réduction encore plus importante du phénotype HTP que l'administration seule de diazoxide ou pinacidil.

Il existe des modèles de souris KO pour *Sur1* et *Sur2*, mais dans ces modèles les conséquences de ce KO au niveau vasculaire pulmonaire n'ont pas été étudiées. Une perspective intéressante pour mieux comprendre le rôle des KATP dans l'HTAP serait de créer des KO de *Abcc8* et/ou *Abcc9* chez le rat et de pouvoir induire ce KO de manière spécifique dans les CML-AP et/ou CE-APs afin de ne pas visualiser les conséquences de cette perte au niveau cardiaque ou bien au niveau du pancréas. Ces KO spécifiques pourraient nous permettre de visualiser le rôle de ces canaux sur les cellules vasculaires pulmonaires, ce qui permettrait de déterminer si leur perte favorise le développement d'un remodelage vasculaire pulmonaire et le développement de l'HTAP.

Références bibliographiques

Abe, Kohtaro, Michie Toba, Abdallah Alzoubi, Masako Ito, Karen A. Fagan, Carlyne D. Cool, Norbert F. Voelkel, Ivan F. McMurtry, et Masahiko Oka. 2010. « Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 121 (25): 2747-54. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.927681.

Abernethy, Abraham D., Kathryn Stackhouse, Stephen Hart, Ganesh Devendra, Thomas M. Bashore, Raed Dweik, et Richard A. Krasuski. 2015. « Impact of diabetes in patients with pulmonary hypertension ». *Pulmonary Circulation* 5 (1): 117-23. https://doi.org/10.1086/679705.

Aguilar-Bryan, Lydia, John P. Clement, Gabriela Gonzalez, Kumud Kunjilwar, Andrey Babenko, et Joseph Bryan. 1998. « Toward Understanding the Assembly and Structure of KATP Channels ». *Physiological Reviews* 78 (1): 227-45. https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.227.

Ahmed, Lamiaa A., Al Arqam Z. Obaid, Hala F. Zaki, et Azza M. Agha. 2014. « Role of Oxidative Stress, Inflammation, Nitric Oxide and Transforming Growth Factor-Beta in the Protective Effect of Diosgenin in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats ». *European Journal of Pharmacology* 740 (octobre): 379-87. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.026.

Ahn, Sang Joon, Ibra S. Fancher, Jing-Tan Bian, Chong Xu Zhang, Sarah Schwab, Robert Gaffin, Shane A. Phillips, et Irena Levitan. 2017. « Inwardly rectifying K+ channels are major contributors to flow-induced vasodilatation in resistance arteries ». *The Journal of Physiology* 595 (7): 2339-64. https://doi.org/10.1113/JP273255.

Al-Chawishly, Mohammed, Oliver Loveland, et Alison M. Gurney. 2022. « Kv7 Channels in Cyclic-Nucleotide Dependent Relaxation of Rat Intra-Pulmonary Artery ». *Biomolecules* 12 (3): 429. https://doi.org/10.3390/biom12030429.

Angelini, Daniel J., Qingning Su, Kazuyo Yamaji-Kegan, Chunling Fan, John T. Skinner, Hunter C. Champion, Michael T. Crow, et Roger A. Johns. 2009. « Hypoxia-Induced Mitogenic Factor (HIMF/FIZZ1/RELMalpha) Induces the Vascular and Hemodynamic Changes of Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 296 (4): L582-593. https://doi.org/10.1152/ajplung.90526.2008.

Antigny, Fabrice, Marie-Camille Chaumais, Marc Humbert, et David Montani. 2019. « Pulmonary Arterial Hypertension in Patient Treated for Multiple Sclerosis with 4-Aminopyridine ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 33 (4): 426-27. https://doi.org/10.1111/fcp.12489.

Antigny, Fabrice, Aurélie Hautefort, Jolyane Meloche, Milia Belacel-Ouari, Boris Manoury, Catherine Rucker-Martin, Christine Péchoux, et al. 2016. « Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 133 (14): 1371-85. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020951.

Antigny, Fabrice, Hélène Le Ribeuz, Marc Humbert, et David Montani. 2021. « Comment on: Transcriptomic Analysis of CFTR-Impaired Endothelial Cells Reveals a pro-Inflammatory Phenotype ». *The European Respiratory Journal* 58 (2): 2101365. https://doi.org/10.1183/13993003.01365-2021.

Applegate, D., et J. D. Pardee. 1992. « Actin-Facilitated Assembly of Smooth Muscle Myosin Induces Formation of Actomyosin Fibrils ». *The Journal of Cell Biology* 117 (6): 1223-30. https://doi.org/10.1083/jcb.117.6.1223.

Archer, S. L., J. M. Huang, V. Hampl, D. P. Nelson, P. J. Shultz, et E. K. Weir. 1994. « Nitric Oxide and CGMP Cause Vasorelaxation by Activation of a Charybdotoxin-Sensitive K Channel by CGMP-Dependent Protein Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (16): 7583-87. https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7583.

Archer, S. L., E. Souil, A. T. Dinh-Xuan, B. Schremmer, J. C. Mercier, A. El Yaagoubi, L. Nguyen-Huu, H. L. Reeve, et V. Hampl. 1998. « Molecular Identification of the Role of Voltage-Gated K+ Channels, Kv1.5 and Kv2.1, in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Control of Resting Membrane Potential in Rat Pulmonary Artery Myocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 101 (11): 2319-30. https://doi.org/10.1172/JCI333.

Archer, Stephen L., Barry London, Vaclav Hampl, Xichen Wu, Ali Nsair, Lakshmi Puttagunta, Kyoko Hashimoto, Ross E. Waite, et Evangelos D. Michelakis. 2001. « Impairment of Hypoxic Pulmonary

Vasoconstriction in Mice Lacking the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.5 ». *The FASEB Journal* 15 (10): 1801-3. https://doi.org/10.1096/fj.00-0649fje.

ATXA Therapeutics Limited. 2021. « A Phase I Trial to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Single and Multiple Ascending Doses of NTP42:KVA4 in Healthy Volunteers ». Clinical trial registration NCT04919863. clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04919863.

Austin, Eric D., Lijiang Ma, Charles LeDuc, Erika Berman Rosenzweig, Alain Borczuk, John A. Phillips, Teresa Palomero, et al. 2012. « Whole Exome Sequencing to Identify a Novel Gene (Caveolin-1) Associated with Human Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 5 (3): 336-43. https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.961888.

Aziz, Qadeer, Yiwen Li, Naomi Anderson, Leona Ojake, Elena Tsisanova, et Andrew Tinker. 2017. « Molecular and functional characterization of the endothelial ATP-sensitive potassium channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (43): 17587-97. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810325.

Aziz, Qadeer, Alison M. Thomas, John Gomes, Richard Ang, William R. Sones, Yiwen Li, Keat-Eng Ng, Lorna Gee, et Andrew Tinker. 2014. « The ATP-Sensitive Potassium Channel Subunit, Kir6.1, in Vascular Smooth Muscle Plays a Major Role in Blood Pressure Control ». *Hypertension* 64 (3): 523-29. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03116.

Babicheva, Aleksandra, Ramon J. Ayon, Tengteng Zhao, Jose F. Ek Vitorin, Nicole M. Pohl, Aya Yamamura, Hisao Yamamura, et al. 2020. « MicroRNA-mediated downregulation of K+ channels in pulmonary arterial hypertension ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 318 (1): L10-26. https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2019.

Bähring, Robert, Carol J. Milligan, Vitya Vardanyan, Birgit Engeland, Ben A. Young, Jens Dannenberg, Ralph Waldschütz, John P. Edwards, Dennis Wray, et Olaf Pongs. 2001. « Coupling of Voltage-Dependent Potassium Channel Inactivation and Oxidoreductase Active Site of Kvβ Subunits* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 22923-29. https://doi.org/10.1074/jbc.M100483200.

Baptista, Rui, Carla Marques, Steve Catarino, Francisco J. Enguita, Marina C. Costa, Paulo Matafome, Mónica Zuzarte, et al. 2018. « MicroRNA-424(322) as a New Marker of Disease Progression in Pulmonary Arterial Hypertension and Its Role in Right Ventricular Hypertrophy by Targeting SMURF1 ». *Cardiovascular Research* 114 (1): 53-64. https://doi.org/10.1093/cvr/cvx187.

Barozzi, Chiara, Margherita Galletti, Luciana Tomasi, Sara De Fanti, Massimiliano Palazzini, Alessandra Manes, Marco Sazzini, et Nazzareno Galiè. 2019. « A Combined Targeted and Whole Exome Sequencing Approach Identified Novel Candidate Genes Involved in Heritable Pulmonary Arterial Hypertension ». *Scientific Reports* 9 (janvier): 753. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37277-0.

Berger, R. M., R. Geiger, J. Hess, A. J. Bogers, et W. J. Mooi. 2001. « Altered Arterial Expression Patterns of Inducible and Endothelial Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Plexogenic Arteriopathy Caused by Congenital Heart Disease ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (6): 1493-99. https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.9908137.

Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, et H. Llewelyn Roderick. 2003. « Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (7): 517-29. https://doi.org/10.1038/nrm1155.

Bertero, T., K.A. Cottrill, S. Annis, B. Bhat, B.R. Gochuico, J.C. Osorio, I. Rosas, et al. 2015. « A YAP/TAZ-MiR-130/301 Molecular Circuit Exerts Systems-Level Control of Fibrosis in a Network of Human Diseases and Physiologic Conditions ». *Scientific Reports* 5. https://doi.org/10.1038/srep18277.

Bertero, Thomas, Katherine Cottrill, Adrienn Krauszman, Yu Lu, Sofia Annis, Andrew Hale, Balkrishen Bhat, et al. 2015. « The MicroRNA-130/301 Family Controls Vasoconstriction in Pulmonary Hypertension* ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (4): 2069-85. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617845.

Best, D. Hunter, Kelli L. Sumner, Benjamin P. Smith, Kristy Damjanovich-Colmenares, Ikue Nakayama, Lynette M. Brown, Youna Ha, et al. 2017. « EIF2AK4 Mutations in Patients Diagnosed With Pulmonary Arterial Hypertension ». *Chest* 151 (4): 821-28. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.11.014.

Black, J. 1968. « Diazoxide and the Treatment of Hypoglycemia: An Historical Review ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 150 (2): 194-203. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1968.tb19045.x.

Bogaard, Harm J., Ramesh Natarajan, Scott C. Henderson, Carlin S. Long, Donatas Kraskauskas, Lisa Smithson, Ramzi Ockaili, Joe M. McCord, et Norbert F. Voelkel. 2009. « Chronic Pulmonary Artery Pressure Elevation Is Insufficient to Explain Right Heart Failure ». *Circulation* 120 (20): 1951-60. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.883843.

Bohnen, Michael S., Lijiang Ma, Na Zhu, Hongjian Qi, Conor McClenaghan, Claudia Gonzaga-Jauregui, Frederick E. Dewey, et al. 2018. « Loss-of-Function ABCC8 Mutations in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation. Genomic and Precision Medicine* 11 (10): e002087. https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002087.

Bohnen, Michael S., Danilo Roman-Campos, Cecile Terrenoire, Jack Jnani, Kevin J. Sampson, Wendy K. Chung, et Robert S. Kass. 2017. « The Impact of Heterozygous KCNK3 Mutations Associated With Pulmonary Arterial Hypertension on Channel Function and Pharmacological Recovery ». *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 6 (9). https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006465.

Bonnet, Sébastien, Evangelos D. Michelakis, Christopher J. Porter, Miguel A. Andrade-Navarro, Bernard Thébaud, Sandra Bonnet, Alois Haromy, et al. 2006. « An Abnormal Mitochondrial-Hypoxia Inducible Factor-1alpha-Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats: Similarities to Human Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 113 (22): 2630-41. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008.

Bordenave, Jennifer, Ly Tu, Nihel Berrebeh, Raphaël Thuillet, Amélie Cumont, Benjamin Le Vely, Elie Fadel, et al. 2020. « Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Pericytes to the Blood Vessel Remodeling in Pulmonary Hypertension ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40 (3): 766-82. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313715.

Borgdorff, Marinus A., Beatrijs Bartelds, Michael G. Dickinson, Paul Steendijk, et Rolf M. F. Berger. 2013. « A Cornerstone of Heart Failure Treatment Is Not Effective in Experimental Right Ventricular Failure ». *International Journal of Cardiology* 169 (3): 183-89. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.08.102.

Boucherat, Olivier, Sophie Chabot, Fabrice Antigny, Frédéric Perros, Steeve Provencher, et Sébastien Bonnet. 2015. « Potassium Channels in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 46 (4): 1167-77. https://doi.org/10.1183/13993003.00798-2015.

Boucherat, Olivier, Geraldine Vitry, Isabelle Trinh, Roxane Paulin, Steeve Provencher, et Sebastien Bonnet. 2017. « The Cancer Theory of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 7 (2): 285-99. https://doi.org/10.1177/2045893217701438.

Brock, M., M. Trenkmann, R.E. Gay, B.A. Michel, S. Gay, M. Fischler, S. Ulrich, R. Speich, et L.C. Huber. 2009. « Interleukin-6 Modulates the Expression of the Bone Morphogenic Protein Receptor Type Ii through a Novel STAT3-MicroRNA Cluster 17/92 Pathway ». *Circulation Research* 104 (10): 1184-91. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.197491.

Bruderer, Shirin, Noémie Hurst, Priska Kaufmann, et Jasper Dingemanse. 2014. « Multiple-Dose up-Titration Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Selexipag, an Orally Available Selective Prostacyclin Receptor Agonist, in Healthy Subjects ». *Pharmacology* 94 (3-4): 148-56. https://doi.org/10.1159/000367630.

Budhiraja, Rohit, Rubin M. Tuder, et Paul M. Hassoun. 2004. « Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 109 (2): 159-65. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000102381.57477.50.

Bulley, Simon, et Jonathan H. Jaggar. 2014. « Cl− channels in smooth muscle cells ». *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466 (5): 861-72. https://doi.org/10.1007/s00424-013-1357-2.

Burg, E D, C V Remillard, et J X-J Yuan. 2008. « Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications ». *British Journal of Pharmacology* 153 (Suppl 1): S99-111. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707635.

Burke, Danielle L., Maria G. Frid, Claudia L. Kunrath, Vijaya Karoor, Adil Anwar, Brandie D. Wagner, Derek Strassheim, et Kurt R. Stenmark. 2009. « Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 297 (2): L238-50. https://doi.org/10.1152/ajplung.90591.2008.

Cain, K., C. Langlais, X. M. Sun, D. G. Brown, et G. M. Cohen. 2001. « Physiological Concentrations of K+ Inhibit Cytochrome C-Dependent Formation of the Apoptosome ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 41985-90. https://doi.org/10.1074/jbc.M107419200.

Caruso, Paola, Benjamin J. Dunmore, Kenny Schlosser, Sandra Schoors, Claudia Dos Santos, Carol Perez-Iratxeta, Jessie R. Lavoie, et al. 2017. « Identification of MicroRNA-124 as a Major Regulator of Enhanced Endothelial Cell Glycolysis in Pulmonary Arterial Hypertension via PTBP1 (Polypyrimidine Tract Binding Protein) and Pyruvate Kinase M2 ». *Circulation* 136 (25): 2451-67. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028034.

Certain, Marie-Caroline, Marie-Camille Chaumais, Xavier Jaïs, Laurent Savale, Andrei Seferian, Florence Parent, Marjolaine Georges, et al. 2021. « Characteristics and Long-Term Outcomes of Pulmonary Venoocclusive Disease Induced by Mitomycin C ». *Chest* 159 (3): 1197-1207. https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.09.238.

Chachin, Motohiko, Mitsuhiko Yamada, Akikazu Fujita, Tetsuro Matsuoka, Kenji Matsushita, et Yoshihisa Kurachi. 2003. « Nateglinide, a D-Phenylalanine Derivative Lacking Either a Sulfonylurea or Benzamido Moiety, Specifically Inhibits Pancreatic Beta-Cell-Type K(ATP) Channels ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304 (3): 1025-32. https://doi.org/10.1124/jpet.102.044917.

Chai, Xiaoyu, Dan Sun, Qian Han, Liang Yi, Yanping Wu, et Xinmin Liu. 2018. « Hypoxia Induces Pulmonary Arterial Fibroblast Proliferation, Migration, Differentiation and Vascular Remodeling via the PI3K/Akt/P70S6K Signaling Pathway ». *International Journal of Molecular Medicine* 41 (5): 2461-72. https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3462.

Chan, Kim W., Hailin Zhang, et Diomedes E. Logothetis. 2003. « N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits ». *The EMBO Journal* 22 (15): 3833-43. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg376.

Chan, N. S., J. McLay, et A. C. Kenmure. 1987. « Reversibility of Primary Pulmonary Hypertension during Six Years of Treatment with Oral Diazoxide ». *British Heart Journal* 57 (2): 207-9. https://doi.org/10.1136/hrt.57.2.207.

Chatterjee, Shampa, Abu-Bakr Al-Mehdi, Irena Levitan, Troy Stevens, et Aron B. Fisher. 2003. « Shear stress increases expression of a KATP channel in rat and bovine pulmonary vascular endothelial cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 285 (4): C959-67. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00511.2002.

Chen, Suet Ching, Antonia Dastamani, Donatella Pintus, Daphne Yau, Sommayya Aftab, Louise Bath, Craig Swinburne, et al. 2019. « Diazoxide-Induced Pulmonary Hypertension in Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia: Recommendations from a Multicentre Study in the United Kingdom ». *Clinical Endocrinology* 91 (6): 770-75. https://doi.org/10.1111/cen.14096.

Chen, T., G. Zhou, Q. Zhou, H. Tang, J.C.F. Ibe, H. Cheng, D. Gou, J. Chen, J.X.-J. Yuan, et J.U. Raj. 2015. « Loss of MicroRNA-17-92 in Smooth Muscle Cells Attenuates Experimental Pulmonary Hypertension via Induction of PDZ and LIM Domain 5 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (6): 678-92. https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0941OC.

Chen, Tianji, Qiyuan Zhou, Haiyang Tang, Melike Bozkanat, Jason X.-J. Yuan, J. Usha Raj, et Guofei Zhou. s. d. « miR-17/20 Controls Prolyl Hydroxylase 2 (PHD2)/Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) to Regulate Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation ». *Journal of the American Heart Association* 5 (12): e004510. https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004510.

Cheron, Céline, Susan Ainslie McBride, Fabrice Antigny, Barbara Girerd, Margot Chouchana, Marie-Camille Chaumais, Xavier Jaïs, et al. 2021. « Sex and Gender in Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Respiratory Review* 30 (162). https://doi.org/10.1183/16000617.0330-2020.

Chester, Adrian H., et Magdi H. Yacoub. 2014. « The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension ». *Global Cardiology Science & Practice* 2014 (2): 62-78. https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.29.

Christman, B. W., C. D. McPherson, J. H. Newman, G. A. King, G. R. Bernard, B. M. Groves, et J. E. Loyd. 1992. « An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 327 (2): 70-75. https://doi.org/10.1056/NEJM199207093270202.

Christou, H., A. Yoshida, V. Arthur, T. Morita, et S. Kourembanas. 1998. « Increased Vascular Endothelial Growth Factor Production in the Lungs of Rats with Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 18 (6): 768-76. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.18.6.2980.

Claesson-Welsh, L., et M. Welsh. 2013. « VEGFA and Tumour Angiogenesis ». *Journal of Internal Medicine* 273 (2): 114-27. https://doi.org/10.1111/joim.12019.

Clapp, L. H., et A. M. Gurney. 1991. « Outward Currents in Rabbit Pulmonary Artery Cells Dissociated with a New Technique ». *Experimental Physiology* 76 (5): 677-93. https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003535.

Cogolludo, Angel, Laura Moreno, Federica Lodi, Giovanna Frazziano, Laura Cobeño, Juan Tamargo, et Francisco Perez-Vizcaino. 2006. « Serotonin Inhibits Voltage-Gated K+ Currents in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells: Role of 5-HT2A Receptors, Caveolin-1, and KV1.5 Channel Internalization ». *Circulation Research* 98 (7): 931-38. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000216858.04599.e1.

Condorelli, Gianluigi, Michael V. G. Latronico, et Elena Cavarretta. 2014. « MicroRNAs in Cardiovascular Diseases: Current Knowledge and the Road Ahead ». *Journal of the American College of Cardiology* 63 (21): 2177-87. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.050.

Connolly, Martin, Benjamin E. Garfield, Alexi Crosby, Nick W. Morrell, Stephen J. Wort, et Paul R. Kemp. 2020. « MiR-1-5p Targets TGF-BR1 and Is Suppressed in the Hypertrophying Hearts of Rats with Pulmonary Arterial Hypertension ». *PLOS ONE* 15 (2): e0229409. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229409.

Cooper, Paige E., Heiko Reutter, Joachim Woelfle, Hartmut Engels, Dorothy K. Grange, Gijs van Haaften, Bregje W. van Bon, Alexander Hoischen, et Colin G. Nichols. 2014. « Cantú Syndrome Resulting from Activating Mutation in the KCNJ8 Gene ». *Human Mutation* 35 (7): 809-13. https://doi.org/10.1002/humu.22555.

Courboulin, Audrey, Roxane Paulin, Nellie J. Giguère, Nehmé Saksouk, Tanya Perreault, Jolyane Meloche, Eric R. Paquet, et al. 2011. « Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension ». *The Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 535-48. https://doi.org/10.1084/jem.20101812.

Cui, Yi, Sandy Tran, Andrew Tinker, et Lucie H. Clapp. 2002. « The Molecular Composition of K(ATP) Channels in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells and Their Modulation by Growth ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (1): 135-43. https://doi.org/10.1165/ajrcmb.26.1.4622.

Cunningham, Kevin P., Lucie H. Clapp, Alistair Mathie, et Emma L. Veale. 2021. « The Prostacyclin Analogue, Treprostinil, Used in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension, is a Potent Antagonist of TREK-1 and TREK-2 Potassium Channels ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (juin): 705421. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.705421.

Cussac, Laure-Anne, Guillaume Cardouat, Nichiren Tiruchellvam Pillai, Marilyne Campagnac, Paul Robillard, Anaïs Montillaud, Christelle Guibert, et al. 2020. « TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 318 (1): L135-46. https://doi.org/10.1152/ajplung.00084.2019.

Dabrowski, M., T. Larsen, F. M. Ashcroft, J. Bondo Hansen, et P. Wahl. 2003. « Potent and Selective Activation of the Pancreatic Beta-Cell Type KATP Channel by Two Novel Diazoxide Analogues ». *Diabetologia* 46 (10): 1375-82. https://doi.org/10.1007/s00125-003-1198-1.

D'Alonzo, G. E., R. J. Barst, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, A. P. Fishman, R. M. Goldring, B. M. Groves, et J. T. Kernis. 1991. « Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. Results from a National Prospective Registry ». *Annals of Internal Medicine* 115 (5): 343-49. https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-5-343.

Daniel, T. O., H. Liu, J. D. Morrow, B. C. Crews, et L. J. Marnett. 1999. « Thromboxane A2 Is a Mediator of Cyclooxygenase-2-Dependent Endothelial Migration and Angiogenesis ». *Cancer Research* 59 (18): 4574-77.

Dart, C., et N. B. Standen. 1995. « Activation of ATP-Dependent K+ Channels by Hypoxia in Smooth Muscle Cells Isolated from the Pig Coronary Artery ». *The Journal of Physiology* 483 (Pt 1) (février): 29-39. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020565.

Davis, Michael J., Hae Jin Kim, Scott D. Zawieja, Jorge A. Castorena-Gonzalez, Peichun Gui, Min Li, Brian T. Saunders, et al. 2020. « Kir6.1-dependent KATP channels in lymphatic smooth muscle and vessel dysfunction in mice with Kir6.1 gain-of-function ». *The Journal of physiology* 598 (15): 3107-27. https://doi.org/10.1113/JP279612.

Decher, Niels, Susanne Rinné, Mauricio Bedoya, Wendy Gonzalez, et Aytug K. Kiper. 2021. « Molecular Pharmacology of K2P Potassium Channels | Cell Physiol Biochem ». *Cellular Physiology & Biochemistry* 55 (S3): 87-107.

Declercq, Mathias, Pauline de Zeeuw, Nadine V. Conchinha, Vincent Geldhof, Anabela S. Ramalho, Melissa García-Caballero, Katleen Brepoels, et al. 2021. « Transcriptomic Analysis of CFTR-Impaired Endothelial Cells Reveals a pro-Inflammatory Phenotype ». *The European Respiratory Journal* 57 (4): 2000261. https://doi.org/10.1183/13993003.00261-2020.

Dierick, France, Julien Solinc, Juliette Bignard, Florent Soubrier, et Sophie Nadaud. 2021. « Progenitor/Stem Cells in Vascular Remodeling during Pulmonary Arterial Hypertension ». *Cells* 10 (6): 1338. https://doi.org/10.3390/cells10061338.

Dignam, Joshua P., Tara E. Scott, Barbara K. Kemp-Harper, et Adrian J. Hobbs. 2021. « Animal Models of Pulmonary Hypertension: Getting to the Heart of the Problem ». *British Journal of Pharmacology*, mars. https://doi.org/10.1111/bph.15444.

Döring, F., C. Derst, E. Wischmeyer, C. Karschin, R. Schneggenburger, J. Daut, et A. Karschin. 1998. « The Epithelial Inward Rectifier Channel Kir7.1 Displays Unusual K+ Permeation Properties ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 18 (21): 8625-36.

Dörschner, H., E. Brekardin, I. Uhde, C. Schwanstecher, et M. Schwanstecher. 1999. « Stoichiometry of Sulfonylurea-Induced ATP-Sensitive Potassium Channel Closure ». *Molecular Pharmacology* 55 (6): 1060-66. https://doi.org/10.1124/mol.55.6.1060.

Dulak, Jozef, Jessy Deshane, Alicja Jozkowicz, et Anupam Agarwal. 2008. « Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology: Focus on Angiogenesis ». *Circulation* 117 (2): 231-41. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.698316.

Eddahibi, Saadia, Christophe Guignabert, Anne-Marie Barlier-Mur, Laurence Dewachter, Elie Fadel, Philippe Dartevelle, Marc Humbert, et al. 2006. « Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension ». *Circulation*, avril. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591321.

Evans, Jonathan D W, Barbara Girerd, David Montani, Xiao-Jian Wang, Nazzareno Galiè, Eric D Austin, Greg Elliott, et al. 2016. « BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis ». *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (2): 129-37. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00544-5.

Eyries, Mélanie, David Montani, Barbara Girerd, Nicolas Favrolt, Marianne Riou, Laurence Faivre, Grégoire Manaud, et al. 2020. « Familial Pulmonary Arterial Hypertension by *KDR* Heterozygous Loss of Function ». *European Respiratory Journal* 55 (4): 1902165. https://doi.org/10.1183/13993003.02165-2019.

Eyries, Mélanie, David Montani, Barbara Girerd, Claire Perret, Anne Leroy, Christine Lonjou, Nadjim Chelghoum, et al. 2014. « EIF2AK4 Mutations Cause Pulmonary Veno-Occlusive Disease, a Recessive Form of Pulmonary Hypertension ». *Nature Genetics* 46 (1): 65-69. https://doi.org/10.1038/ng.2844.

Eyries, Mélanie, David Montani, Sophie Nadaud, Barbara Girerd, Marilyne Levy, Arnaud Bourdin, Romain Trésorier, et al. 2019. « Widening the Landscape of Heritable Pulmonary Hypertension Mutations in Paediatric and Adult Cases ». *European Respiratory Journal* 53 (3). https://doi.org/10.1183/13993003.01371-2018.

Fan, Zheng, et Jonathan C. Makielski. 1997. « Anionic Phospholipids Activate ATP-Sensitive Potassium Channels* ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (9): 5388-95. https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5388.

Feinmark, Steven J., et Richard B. Robinson. 2012. Method of treating a condition associated with phosphorylation of TASK-1. United States US8097650B2, filed 2 août 2006, et issued 17 janvier 2012. https://patents.google.com/patent/US8097650B2/en.

Ferraz, Ana Paula, Fernando A. C. Seara, Emanuelle F. Baptista, Thais S. Barenco, Thais B. B. Sottani, Natalia S. C. Souza, Ainá E. Domingos, et al. 2021. « BKCa Channel Activation Attenuates the

Pathophysiological Progression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Wistar Rats ». *Cardiovascular Drugs and Therapy* 35 (4): 719-32. https://doi.org/10.1007/s10557-020-07115-5.

Firth, Amy L., Oleksandr Platoshyn, Elena E. Brevnova, Elyssa D. Burg, Frank Powell, Gabriel H. Haddad, et Jason X.-J. Yuan. 2009. « Hypoxia Selectively Inhibits KCNA5 Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177 (1): 101-11. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05040.x.

Firth, Amy L., Carmelle V. Remillard, Oleksandr Platoshyn, Ivana Fantozzi, Eun A. Ko, et Jason X.-J. Yuan. 2011. « Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels ». *Pulmonary Circulation* 1 (1): 48-71. https://doi.org/10.4103/2045-8932.78103.

Flagg, Thomas P., Brian Patton, Ricard Masia, Carrie Mansfield, Anatoli N. Lopatin, Kathryn A. Yamada, et Colin G. Nichols. 2007. « Arrhythmia Susceptibility and Premature Death in Transgenic Mice Overexpressing Both SUR1 and Kir6.2[DeltaN30,K185Q] in the Heart ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (1): H836-845. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00011.2007.

Galiè, Nazzareno, Bruce H. Brundage, Hossein A. Ghofrani, Ronald J. Oudiz, Gerald Simonneau, Zeenat Safdar, Shelley Shapiro, et al. 2009. « Tadalafil Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 119 (22): 2894-2903. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839274.

Galiè, Nazzareno, Hossein A. Ghofrani, Adam Torbicki, Robyn J. Barst, Lewis J. Rubin, David Badesch, Thomas Fleming, et al. 2005. « Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 353 (20): 2148-57. https://doi.org/10.1056/NEJMoa050010.

Galié, Nazzareno, Alessandra Manes, et Angelo Branzi. 2004. « The endothelin system in pulmonary arterial hypertension ». *Cardiovascular Research* 61 (2): 227-37. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.11.026.

Galiè, Nazzareno, Horst Olschewski, Ronald J. Oudiz, Fernando Torres, Adaani Frost, Hossein A. Ghofrani, David B. Badesch, et al. 2008. « Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Ambrisentan in Pulmonary Arterial Hypertension, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter, Efficacy (ARIES) Study 1 and 2 ». *Circulation* 117 (23): 3010-19. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.742510.

Gamen, Elisabetta, Werner Seeger, et Soni Savai Pullamsetti. 2016. « The Emerging Role of Epigenetics in Pulmonary Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 48 (3): 903-17. https://doi.org/10.1183/13993003.01714-2015.

Garcia-Rivas, Gerardo, Carlos Jerjes-Sánchez, David Rodriguez, José Garcia-Pelaez, et Victor Trevino. 2017. « A systematic review of genetic mutations in pulmonary arterial hypertension ». *BMC Medical Genetics* 18 (août): 82. https://doi.org/10.1186/s12881-017-0440-5.

Garg, Lohit, Ghulam Akbar, Sahil Agrawal, Manyoo Agarwal, Leila Khaddour, Rishin Handa, Aakash Garg, Mahek Shah, Brijesh Patel, et Bhavinkumar D. Dalal. 2017. « Drug-Induced Pulmonary Arterial Hypertension: A Review ». *Heart Failure Reviews* 22 (3): 289-97. https://doi.org/10.1007/s10741-017-9612-9.

Gelinas, Simone M., Clare E. Benson, Mohammed A. Khan, Rolf M. F. Berger, Richard C. Trembath, Rajiv D. Machado, et Laura Southgate. 2020. « Whole Exome Sequence Analysis Provides Novel Insights into the Genetic Framework of Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension ». *Genes* 11 (11): 1328. https://doi.org/10.3390/genes11111328.

Ghofrani, Hossein-Ardeschir, Nazzareno Galiè, Friedrich Grimminger, Ekkehard Grünig, Marc Humbert, Zhi-Cheng Jing, Anne M. Keogh, et al. 2013. « Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». Research-article. Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMoa1209655. Massachusetts Medical Society. World. 24 juillet 2013. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209655.

Giaid, A., et D. Saleh. 1995. « Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 333 (4): 214-21. https://doi.org/10.1056/NEJM199507273330403.

Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, et D. J. Stewart. 1993. « Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 328 (24): 1732-39. https://doi.org/10.1056/NEJM199306173282402.

Gou, Deming, Ramaswamy Ramchandran, Xiao Peng, Lijun Yao, Kang Kang, Joy Sarkar, Zhixin Wang, Goufei Zhou, et J. Usha Raj. 2012. « miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 303 (8): L682-91. https://doi.org/10.1152/ajplung.00344.2011.

Gräf, Stefan, Matthias Haimel, Marta Bleda, Charaka Hadinnapola, Laura Southgate, Wei Li, Joshua Hodgson, et al. 2018. « Identification of Rare Sequence Variation Underlying Heritable Pulmonary Arterial Hypertension ». *Nature Communications* 9 (1): 1416. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03672-4.

Gribble, F. M., R. Ashfield, C. Ammälä, et F. M. Ashcroft. 1997. « Properties of Cloned ATP-Sensitive K+ Currents Expressed in Xenopus Oocytes ». *The Journal of Physiology* 498 (Pt 1) (janvier): 87-98. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021843.

Gribble, F. M., S. J. Tucker, S. Seino, et F. M. Ashcroft. 1998. « Tissue Specificity of Sulfonylureas: Studies on Cloned Cardiac and Beta-Cell K(ATP) Channels ». *Diabetes* 47 (9): 1412-18. https://doi.org/10.2337/diabetes.47.9.1412.

Grosse, Gisela, Dirk Eulitz, Theodor Thiele, Ingrid Pahner, Sascha Schröter, Shigeo Takamori, Johannes Grosse, et al. 2003. « Axonal Sorting of Kir3.3 Defines a GABA-Containing Neuron in the CA3 Region of Rodent Hippocampus ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 24 (3): 709-24. https://doi.org/10.1016/s1044-7431(03)00234-3.

Guéguinou, Maxime, Aurélie Chantôme, Gaëlle Fromont, Philippe Bougnoux, Christophe Vandier, et Marie Potier-Cartereau. 2014. « KCa and Ca(2+) Channels: The Complex Thought ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (10): 2322-33. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.019.

Guignabert, Christophe, Carole Phan, Andrei Seferian, Alice Huertas, Ly Tu, Raphaël Thuillet, Caroline Sattler, et al. 2016. « Dasatinib Induces Lung Vascular Toxicity and Predisposes to Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3207-18. https://doi.org/10.1172/JCI86249.

Gurney, A. M., O. N. Osipenko, D. MacMillan, K. M. McFarlane, R. J. Tate, et F. E. J. Kempsill. 2003. « Two-Pore Domain K Channel, TASK-1, in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 93 (10): 957-64. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000099883.68414.61.

Haarman, Meindina G., Wilhelmina S. Kerstjens-Frederikse, Theresia R. Vissia-Kazemier, Karel T. N. Breeman, Wim Timens, Yvonne J. Vos, Marc T. R. Roofthooft, Hans L. Hillege, et Rolf M. F. Berger. 2020. « The Genetic Epidemiology of Pediatric Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Journal of Pediatrics* 225 (octobre): 65-73.e5. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.05.051.

Harakalova, Magdalena, Jeske J. T. van Harssel, Paulien A. Terhal, Stef van Lieshout, Karen Duran, Ivo Renkens, David J. Amor, et al. 2012. « Dominant Missense Mutations in ABCC9 Cause Cantú Syndrome ». *Nature Genetics* 44 (7): 793-96. https://doi.org/10.1038/ng.2324.

Harrison, R. E., J. A. Flanagan, M. Sankelo, S. A. Abdalla, J. Rowell, R. D. Machado, C. G. Elliott, et al. 2003. « Molecular and Functional Analysis Identifies ALK-1 as the Predominant Cause of Pulmonary Hypertension Related to Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia ». *Journal of Medical Genetics* 40 (12): 865-71. https://doi.org/10.1136/jmg.40.12.865.

Harrison, Rachel E., Rolf Berger, Sheila G. Haworth, Robert Tulloh, Christoph J. Mache, Nicholas W. Morrell, Micheala A. Aldred, et Richard C. Trembath. 2005. « Transforming Growth Factor-β Receptor Mutations and Pulmonary Arterial Hypertension in Childhood ». *Circulation* 111 (4): 435-41. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000153798.78540.87.

Hautefort, Aurélie, Barbara Girerd, David Montani, Sylvia Cohen-Kaminsky, Laura Price, Bart N. Lambrecht, Marc Humbert, et Frédéric Perros. 2015. « T-Helper 17 Cell Polarization in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Chest* 147 (6): 1610-20. https://doi.org/10.1378/chest.14-1678.

HEBERT, STEVEN C., GARY DESIR, GERHARD GIEBISCH, et WENHUI WANG. 2005. « Molecular Diversity and Regulation of Renal Potassium Channels ». *Physiological reviews* 85 (1): 319-71. https://doi.org/10.1152/physrev.00051.2003.

Hernández-Sánchez, Jules, Louise Harlow, Colin Church, Sean Gaine, Emily Knightbridge, Kate Bunclark, Dee Gor, et al. 2018. « Clinical Trial Protocol for TRANSFORM-UK: A Therapeutic Open-Label Study of Tocilizumab in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 8 (1): 2045893217735820. https://doi.org/10.1177/2045893217735820.

Hibino, Hiroshi, Atsushi Inanobe, Kazuharu Furutani, Shingo Murakami, Ian Findlay, et Yoshihisa Kurachi. 2010. « Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles ». *Physiological Reviews* 90 (1): 291-366. https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2009.

Higasa, Koichiro, Aiko Ogawa, Chikashi Terao, Masakazu Shimizu, Shinji Kosugi, Ryo Yamada, Hiroshi Date, Hiromi Matsubara, et Fumihiko Matsuda. 2017. « A burden of rare variants in BMPR2 and KCNK3 contributes to a risk of familial pulmonary arterial hypertension ». *BMC Pulmonary Medicine* 17 (avril). https://doi.org/10.1186/s12890-017-0400-z.

Higashi, K., A. Fujita, A. Inanobe, M. Tanemoto, K. Doi, T. Kubo, et Y. Kurachi. 2001. « An Inwardly Rectifying K(+) Channel, Kir4.1, Expressed in Astrocytes Surrounds Synapses and Blood Vessels in Brain ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 281 (3): C922-931. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.3.C922.

Hogg, D. S., G. McMurray, et R. Z. Kozlowski. 2002. « Endothelial Cells Freshly Isolated from Small Pulmonary Arteries of the Rat Possess Multiple Distinct K+ Current Profiles ». *Lung* 180 (4): 203-14. https://doi.org/10.1007/s004080000094.

Hong, Zhigang, Kuang-Hueih Chen, Asish DasGupta, Francois Potus, Kimberly Dunham-Snary, Sebastien Bonnet, Lian Tian, et al. 2017. « MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-regulate Mitochondrial Calcium Uniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension Cancer Phenotype ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 195 (4): 515-29. https://doi.org/10.1164/rccm.201604-0814OC.

Hsu, Kate, Jegatheesan Seharaseyon, Peihong Dong, Stephan Bour, et Eduardo Marbán. 2004. « Mutual Functional Destruction of HIV-1 Vpu and Host TASK-1 Channel ». *Molecular Cell* 14 (2): 259-67. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00183-2.

Humbert, M., G. Monti, F. Brenot, O. Sitbon, A. Portier, L. Grangeot-Keros, P. Duroux, P. Galanaud, G. Simonneau, et D. Emilie. 1995. « Increased Interleukin-1 and Interleukin-6 Serum Concentrations in Severe Primary Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151 (5): 1628-31. https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.5.7735624.

Humbert, M., G. Monti, M. Fartoukh, A. Magnan, F. Brenot, B. Rain, F. Capron, et al. 1998. « Platelet-Derived Growth Factor Expression in Primary Pulmonary Hypertension: Comparison of HIV Seropositive and HIV Seronegative Patients ». *European Respiratory Journal* 11 (3): 554-59.

Humbert, Marc, Vallerie McLaughlin, J. Simon R. Gibbs, Mardi Gomberg-Maitland, Marius M. Hoeper, Ioana R. Preston, Rogerio Souza, et al. 2021. « Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *New England Journal of Medicine*, mars. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024277.

Iannone, L., L. Zhao, O. Dubois, L. Duluc, C.J. Rhodes, J. Wharton, M.R. Wilkins, J. Leiper, et B. Wojciak-Stothard. 2014. « MiR-21/DDAH1 Pathway Regulates Pulmonary Vascular Responses to Hypoxia ». *Biochemical Journal* 462 (1): 103-12. https://doi.org/10.1042/BJ20140486.

Iglarz, Marc, Christoph Binkert, Keith Morrison, Walter Fischli, John Gatfield, Alexander Treiber, Thomas Weller, et al. 2008. « Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327 (3): 736-45. https://doi.org/10.1124/jpet.108.142976.

International PPH Consortium, K. B. Lane, R. D. Machado, M. W. Pauciulo, J. R. Thomson, J. A. Phillips, J. E. Loyd, W. C. Nichols, et R. C. Trembath. 2000. « Heterozygous Germline Mutations in BMPR2, Encoding a TGF-Beta Receptor, Cause Familial Primary Pulmonary Hypertension ». *Nature Genetics* 26 (1): 81-84. https://doi.org/10.1038/79226.

Itoh, Akihide, Jun Nishihira, Hironi Makita, Kenji Miyamoto, Etsuro Yamaguchi, et Masaharu Nishimura. 2003. « Effects of IL-1β, TNF-α, and Macrophage Migration Inhibitory Factor on Prostacyclin Synthesis in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *Respirology* 8 (4): 467-72. https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00491.x.

Itoh, Takefumi, Noritoshi Nagaya, Hatsue Ishibashi-Ueda, Shingo Kyotani, Hideo Oya, Fumio Sakamaki, Hiroshi Kimura, et Norifumi Nakanishi. 2006. « Increased Plasma Monocyte Chemoattractant

Protein-1 Level in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 11 (2): 158-63. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00821.x.

Janigro, D., G. A. West, E. L. Gordon, et H. R. Winn. 1993. « ATP-Sensitive K+ Channels in Rat Aorta and Brain Microvascular Endothelial Cells ». *The American Journal of Physiology* 265 (3 Pt 1): C812-821. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.3.C812.

Jasmin, Jean-François, Martin Lucas, Peter Cernacek, et Jocelyn Dupuis. 2001. « Effectiveness of a Nonselective ETA/B and a Selective ETA Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 103 (2): 314-18. https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.2.314.

Jha, Ruchira M., Anupama Rani, Shashvat M. Desai, Sudhanshu Raikwar, Sandra Mihaljevic, Amanda Munoz-Casabella, Patrick M. Kochanek, et al. 2021. « Sulfonylurea Receptor 1 in Central Nervous System Injury: An Updated Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11899. https://doi.org/10.3390/ijms222111899.

Jiao, Yu-Rui, Wei Wang, Peng-Cheng Lei, Hui-Ping Jia, Jie Dong, Yun-Qian Gou, Cheng-Long Chen, Jie Cao, Ya-Feng Wang, et Yi-Kun Zhu. 2019. « 5-HTT, BMPR2, EDN1, ENG, KCNA5 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Pulmonary Arterial Hypertension: A Meta-Analysis ». *Gene* 680 (janvier): 34-42. https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.020.

Jin, Youpeng, Tingting Pang, Leif D. Nelin, Wei Wang, Yulin Wang, Jinchun Yan, et Chun Zhao. 2015. « MKP-1 Is a Target of MiR-210 and Mediate the Negative Regulation of MiR-210 Inhibitor on Hypoxic HPASMC Proliferation ». *Cell Biology International* 39 (1): 113-20. https://doi.org/10.1002/cbin.10339.

Johns, Roger A., Eiki Takimoto, Lucas W. Meuchel, Esra Elsaigh, Ailan Zhang, Nicola M. Heller, Gregg L. Semenza, et Kazuyo Yamaji-Kegan. 2016. « Hypoxia-Inducible Factor 1α Is a Critical Downstream Mediator for Hypoxia-Induced Mitogenic Factor (FIZZ1/RELMα)–Induced Pulmonary Hypertension ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (1): 134-44. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306710.

Jonigk, Danny, Heiko Golpon, Clemens L. Bockmeyer, Lavinia Maegel, Marius M. Hoeper, Jens Gottlieb, Nils Nickel, et al. 2011. « Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The American Journal of Pathology* 179 (1): 167-79. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.040.

Joshi, Shreena, Vojtech Sedivy, Daniel Hodyc, Jan Herget, et Alison M. Gurney. 2009. « KCNQ Modulators Reveal a Key Role for KCNQ Potassium Channels in Regulating the Tone of Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 329 (1): 368-76. https://doi.org/10.1124/jpet.108.147785.

Kamm, Kristine E., et James T. Stull. 2001. « Dedicated Myosin Light Chain Kinases with Diverse Cellular Functions* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (7): 4527-30. https://doi.org/10.1074/jbc.R000028200.

Kaneko, F. T., A. C. Arroliga, R. A. Dweik, S. A. Comhair, D. Laskowski, R. Oppedisano, M. J. Thomassen, et S. C. Erzurum. 1998. « Biochemical Reaction Products of Nitric Oxide as Quantitative Markers of Primary Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158 (3): 917-23. https://doi.org/10.1164/ajrccm.158.3.9802066.

Kang, Kang, Xiao Peng, Xiaoying Zhang, Yuna Wang, Lishu Zhang, Li Gao, Tingting Weng, et al. 2013. « MicroRNA-124 Suppresses the Transactivation of Nuclear Factor of Activated T Cells by Targeting Multiple Genes and Inhibits the Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (35): 25414-27. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460287.

Katnik, C., et D. J. Adams. 1997. « Characterization of ATP-Sensitive Potassium Channels in Freshly Dissociated Rabbit Aortic Endothelial Cells ». *The American Journal of Physiology* 272 (5 Pt 2): H2507-2511. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2507.

Katz, Michael G., Anthony S. Fargnoli, Sarah M. Gubara, Malik Bisserier, Yassine Sassi, Charles R. Bridges, Roger J. Hajjar, et Lahouaria Hadri. 2019. « The Left Pneumonectomy Combined with Monocrotaline or Sugen as a Model of Pulmonary Hypertension in Rats ». *Journal of visualized experiments : JoVE*, n° 145 (mars): 10.3791/59050. https://doi.org/10.3791/59050.

Kerstjens-Frederikse, Wilhelmina S, Ernie M H F Bongers, Marcus T R Roofthooft, Edward M Leter, J Menno Douwes, Arie Van Dijk, Anton Vonk-Noordegraaf, et al. 2013. « TBX4 mutations (small

patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension ». *Journal of Medical Genetics* 50 (8): 500-506. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101152.

Kharade, Sujay V., Juan Vicente Sanchez-Andres, Mark G. Fulton, Elaine L. Shelton, Anna L. Blobaum, Darren W. Engers, Christopher S. Hofmann, et al. 2019. « Structure-Activity Relationships, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of the Kir6.2/SUR1-Specific Channel Opener VU0071063 ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 370 (3): 350-59. https://doi.org/10.1124/jpet.119.257204.

Kim, Jongmin, Yujung Kang, Yoko Kojima, Janet K. Lighthouse, Xiaoyue Hu, Micheala A. Aldred, Danielle L. McLean, et al. 2013. « An Endothelial Apelin-FGF Link Mediated by MiR-424 and MiR-503 Is Disrupted in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Nature Medicine* 19 (1): 74-82. https://doi.org/10.1038/nm.3040.

Klinger, James R., Steven H. Abman, et Mark T. Gladwin. 2013. « Nitric Oxide Deficiency and Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (6): 639-46. https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0686PP.

Koster, Joseph C., Maria S. Remedi, Ricard Masia, Brian Patton, Ailing Tong, et Colin G. Nichols. 2006. « Expression of ATP-Insensitive KATP Channels in Pancreatic β-Cells Underlies a Spectrum of Diabetic Phenotypes ». *Diabetes* 55 (11): 2957-64. https://doi.org/10.2337/db06-0732.

Kroigaard, Christel, Thomas Dalsgaard, Gorm Nielsen, Britt E Laursen, Hans Pilegaard, Ralf Köhler, et Ulf Simonsen. 2012. « Activation of endothelial and epithelial KCa2.3 calcium-activated potassium channels by NS309 relaxes human small pulmonary arteries and bronchioles ». *British Journal of Pharmacology* 167 (1): 37-47. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01986.x.

Krug, L. M., et B. C. Berk. 1992. « Na+, K(+)-Adenosine Triphosphatase Regulation in Hypertrophied Vascular Smooth Muscle Cells ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 20 (2): 144-50. https://doi.org/10.1161/01.hyp.20.2.144.

Kuo, L., et J. D. Chancellor. 1995. « Adenosine Potentiates Flow-Induced Dilation of Coronary Arterioles by Activating KATP Channels in Endothelium ». *The American Journal of Physiology* 269 (2 Pt 2): H541-549. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.2.H541.

Kurdyukov, Sergey, Cody A. Eccles, Ankit A. Desai, Manuel Gonzalez-Garay, Jason X.-J. Yuan, Joe G. N. Garcia, Olga Rafikova, et Ruslan Rafikov. 2018. « New cases of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in Pulmonary Arterial Hypertension ». *PLoS ONE* 13 (8): e0203493. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203493.

Kuwano, Keiichi, Asami Hashino, Kumiko Noda, Keiji Kosugi, et Kenji Kuwabara. 2008. « A Long-Acting and Highly Selective Prostacyclin Receptor Agonist Prodrug, 2-{4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-Yl)(Isopropyl)Amino]Butoxy}-N-(Methylsulfonyl)Acetamide (NS-304), Ameliorates Rat Pulmonary Hypertension with Unique Relaxant Responses of Its Active Form, {4-[(5,6-Diphenylpyrazin-2-Yl)(Isopropyl)Amino]Butoxy}acetic Acid (MRE-269), on Rat Pulmonary Artery ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (3): 691-99. https://doi.org/10.1124/jpet.108.138305.

Lago-Docampo, Mauro, Jair Tenorio, Ignacio Hernández-González, Carmen Pérez-Olivares, Pilar Escribano-Subías, Guillermo Pousada, Adolfo Baloira, Miguel Arenas, Pablo Lapunzina, et Diana Valverde. 2020. « Characterization of rare ABCC8 variants identified in Spanish pulmonary arterial hypertension patients ». *Scientific Reports* 10 (septembre): 15135. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72089-1.

Lambert, Mélanie, Angèle Boet, Catherine Rucker-Martin, Pedro Mendes-Ferreira, Véronique Capuano, Stéphane Hatem, Rui Adão, et al. 2018. « Loss of KCNK3 Is a Hallmark of RV Hypertrophy/Dysfunction Associated with Pulmonary Hypertension ». *Cardiovascular Research* 114 (6): 880-93. https://doi.org/10.1093/cvr/cvy016.

Lambert, Mélanie, Véronique Capuano, Angèle Boet, Laurent Tesson, Thomas Bertero, Morad K. Nakhleh, Séverine Remy, et al. 2019. « Characterization of Kcnk3-Mutated Rat, a Novel Model of Pulmonary Hypertension ». *Circulation Research* 125 (7): 678-95. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314793.

Lambert, Mélanie, Véronique Capuano, Andrea Olschewski, Jessica Sabourin, Chandran Nagaraj, Barbara Girerd, Jason Weatherald, Marc Humbert, et Fabrice Antigny. 2018. « Ion Channels in Pulmonary

Hypertension: A Therapeutic Interest? » *International Journal of Molecular Sciences* 19 (10): 3162. https://doi.org/10.3390/ijms19103162.

Lambert, Mélanie, Pedro Mendes-Ferreira, Maria-Rosa Ghigna, Hélène LeRibeuz, Rui Adão, Angèle Boet, Véronique Capuano, et al. 2021. « Kcnk3 Dysfunction Exaggerates the Development of Pulmonary Hypertension Induced by Left Ventricular Pressure Overload ». *Cardiovascular Research* 117 (12): 2474-88. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab016.

Lang, Irene M, et Massimiliano Palazzini. 2019. « The burden of comorbidities in pulmonary arterial hypertension ». *European Heart Journal Supplements : Journal of the European Society of Cardiology* 21 (Suppl K): K21-28. https://doi.org/10.1093/eurheartj/suz205.

Langleben, David, Brian W. Christman, Robyn J Barst, Virgil C. Dias, Nazzareno Galiè, Timothy W. Higenbottam, Meinhard Kneussl, et al. 2002. « Effects of the Thromboxane Synthetase Inhibitor and Receptor Antagonist Terbogrel in Patients with Primary Pulmonary Hypertension ». *American Heart Journal* 143 (5): 4A-10A. https://doi.org/10.1067/mhj.2002.121806.

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

Le Cras, T. D., C. Xue, A. Rengasamy, et R. A. Johns. 1996. « Chronic Hypoxia Upregulates Endothelial and Inducible NO Synthase Gene and Protein Expression in Rat Lung ». *The American Journal of Physiology* 270 (1 Pt 1): L164-170. https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.270.1.L164.

Le Hiress, Morane, Ly Tu, Nicolas Ricard, Carole Phan, Raphaël Thuillet, Elie Fadel, Peter Dorfmüller, et al. 2015. « Proinflammatory Signature of the Dysfunctional Endothelium in Pulmonary Hypertension. Role of the Macrophage Migration Inhibitory Factor/CD74 Complex ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192 (8): 983-97. https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0322OC.

Le Ribeuz, Hélène, Véronique Capuano, Barbara Girerd, Marc Humbert, David Montani, et Fabrice Antigny. 2020. « Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Biomolecules* 10 (9). https://doi.org/10.3390/biom10091261.

Le Ribeuz, Hélène, Audrey Courboulin, Maria-Rosa Ghigna, Mélanie Lambert, Aurélie Hautefort, Marc Humbert, David Montani, Sylvia Cohen-Kaminsky, Frédéric Perros, et Fabrice Antigny. 2020. « In Vivo MiR-138-5p Inhibition Alleviates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension and Normalizes Pulmonary KCNK3 and SLC45A3 Expression ». *Respiratory Research* 21 (1): 186. https://doi.org/10.1186/s12931-020-01444-7.

Le Ribeuz, Hélène, Lucie To, Maria-Rosa Ghigna, Clémence Martin, Chandran Nagaraj, Elise Dreano, Catherine Rucker-Martin, et al. 2021. « Involvement of CFTR in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 58 (5): 2000653. https://doi.org/10.1183/13993003.00653-2020.

Lee, Hyeryon, Kwan Chang Kim, et Young Mi Hong. 2018. « Change of voltage-gated potassium channel 1.7 expressions in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model ». *Korean Journal of Pediatrics* 61 (9): 271-78. https://doi.org/10.3345/kjp.2018.06457.

Lee, S. L., W. W. Wang, G. A. Finlay, et B. L. Fanburg. 1999. « Serotonin Stimulates Mitogen-Activated Protein Kinase Activity through the Formation of Superoxide Anion ». *The American Journal of Physiology* 277 (2): L282-291. https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.277.2.L282.

Lee, Wai-Ting Nicola, Yi Ling, Karen K. Sheares, Joanna Pepke-Zaba, Andrew John Peacock, et Martin Keith Johnson. 2012. « Predicting Survival in Pulmonary Arterial Hypertension in the UK ». *European Respiratory Journal* 40 (3): 604-11. https://doi.org/10.1183/09031936.00196611.

Lefer, David J., Colin G. Nichols, et William A. Coetzee. 2009. « Sulfonylurea Receptor 1 Subunits of ATP-Sensitive Potassium Channels and Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 19 (2): 61-67. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2009.04.008.

LekanneDeprez, Ronald H., Maurice J. B. van den Hoff, Piet A. J. de Boer, Jan M. Ruijter, Adrie A. W. Maas, Robert A. F. M. Chamuleau, Wouter H. Lamers, et Antoon F. M. Moorman. 1998. « Changing Patterns of Gene Expression in the Pulmonary Trunk-Banded Rat Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30 (9): 1877-88. https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0753.

Li, Anlong, Russell H. Knutsen, Haixia Zhang, Patrick Osei-Owusu, Alex Moreno-Dominguez, Theresa M. Harter, Keita Uchida, et al. 2013. « Hypotension Due to Kir6.1 Gain-of-Function in Vascular

Smooth Muscle ». *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 2 (4): e000365. https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000365.

Li, L., J. Wu, et C. Jiang. 2003. « Differential Expression of Kir6.1 and SUR2B MRNAs in the Vasculature of Various Tissues in Rats ». *The Journal of Membrane Biology* 196 (1): 61-69. https://doi.org/10.1007/s00232-003-0625-z.

Li, Li, Il-Kwon Kim, Valorie Chiasson, Piyali Chatterjee, et Sudhiranjan Gupta. 2017. « NF-KB Mediated MiR-130a Modulation in Lung Microvascular Cell Remodeling: Implication in Pulmonary Hypertension ». *Experimental Cell Research* 359 (1): 235-42. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.024.

Li, Shanshan, Yajuan Ran, Dandan Zhang, Jianguo Chen, Shuzhen Li, et Daling Zhu. 2013. « microRNA-138 plays a role in hypoxic pulmonary vascular remodelling by targeting Mst1 ». *Biochemical Journal* 452 (2): 281-91. https://doi.org/10.1042/BJ20120680.

Li, Ying, Bo Shi, Liping Huang, Xin Wang, Xiaona Yu, Baosheng Guo, et Weidong Ren. 2016. « Suppression of the expression of hypoxia-inducible factor-1α by RNA interference alleviates hypoxia-induced pulmonary hypertension in adult rats ». *International Journal of Molecular Medicine* 38 (6): 1786-94. https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2773.

Li, Yiwen, Qadeer Aziz, Naomi Anderson, Leona Ojake, et Andrew Tinker. 2020. « Endothelial ATP-Sensitive Potassium Channel Protects Against the Development of Hypertension and Atherosclerosis ». *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 76 (3): 776-84. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.15355.

Liu, Aijun, Yifan Liu, Bin Li, Ming Yang, Yang Liu, et Junwu Su. 2019. « Role of MiR-223-3p in Pulmonary Arterial Hypertension via Targeting ITGB3 in the ECM Pathway ». *Cell Proliferation* 52 (2): e12550. https://doi.org/10.1111/cpr.12550.

Liu, H., Y. Tao, M. Chen, J. Yu, W.-J. Li, L. Tao, Y. Li, et F. Li. 2016. « Upregulation of MicroRNA-214 Contributes to the Development of Vascular Remodeling in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension Via Targeting CCNL2 ». *Scientific Reports* 6. https://doi.org/10.1038/srep24661.

Liu, Jin-Jun, Heng Zhang, Fang Xing, Bi Tang, Shi-Li Wu, Ling Xuan, Pin-Fang Kang, et al. 2018. « MicroRNA-138 Promotes Proliferation and Suppresses Mitochondrial Depolarization in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells through Targeting TASK-1 ». *Molecular Medicine Reports* 17 (2): 3021-27. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8200.

Liu, Ting, Xiao-Zhou Zou, Ning Huang, Xiao-Yue Ge, Mao-Zhong Yao, Hong Liu, Zheng Zhang, et Chang-Ping Hu. 2019. « Down-Regulation of MiR-204 Attenuates Endothelial-Mesenchymal Transition by Enhancing Autophagy in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension ». *European Journal of Pharmacology* 863 (novembre): 172673. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172673.

Liu, Yinglin, Yuichiro J. Suzuki, Regina M. Day, et Barry L. Fanburg. 2004. « Rho Kinase-Induced Nuclear Translocation of ERK1/ERK2 in Smooth Muscle Cell Mitogenesis Caused by Serotonin ». *Circulation Research* 95 (6): 579-86. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141428.53262.a4.

Liu, Yun, Yonggang Cao, Shuyang Sun, Jinquan Zhu, Shan Gao, Jie Pang, Daling Zhu, et Zengxian Sun. 2016. « Transforming Growth Factor-Beta1 Upregulation Triggers Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Apoptosis Imbalance in Rats with Hypoxic Pulmonary Hypertension via the PTEN/AKT Pathways ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 77 (août): 141-54. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.06.006.

Lu, Yang, Jing Huang, Shuang Geng, Hao Chen, Cheng Song, Shan Zhu, Su Zhao, Mingli Yuan, Xueying Li, et Hongling Hu. 2017. « MitoKATP regulating HIF/miR210/ISCU signaling axis and formation of a positive feedback loop in chronic hypoxia-induced PAH rat model ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 13 (5): 1697-1701. https://doi.org/10.3892/etm.2017.4161.

Luo, Y., H.-Y. Dong, B. Zhang, Z. Feng, Y. Liu, Y.-Q. Gao, M.-Q. Dong, et Z.-C. Li. 2015. « MiR-29a-3p Attenuates Hypoxic Pulmonary Hypertension by Inhibiting Pulmonary Adventitial Fibroblast Activation ». *Hypertension* 65 (2): 414-20. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04600.

Ma, Lijiang, Danilo Roman-Campos, Eric D. Austin, Mélanie Eyries, Kevin S. Sampson, Florent Soubrier, Marine Germain, et al. 2013. « A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England journal of medicine* 369 (4): 351-61. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211097.

Machado, Rajiv, Carrie L. Welch, Matthias Haimel, Marta Bleda, Elizabeth Colglazier, John D. Coulson, Marusa Debeljak, et al. 2021. « Biallelic Variants of ATP13A3 Cause Dose-Dependent Childhood-Onset Pulmonary Arterial Hypertension Characterised by Extreme Morbidity and Mortality ». *Journal of Medical Genetics*, septembre. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2021-107831.

MacLean, M. R., G. Sweeney, M. Baird, K. M. McCulloch, M. Houslay, et I. Morecroft. 1996. « 5-Hydroxytryptamine Receptors Mediating Vasoconstriction in Pulmonary Arteries from Control and Pulmonary Hypertensive Rats ». *British Journal of Pharmacology* 119 (5): 917-30. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15760.x.

MacLean, Margaret R., Graeme A. Deuchar, Martin N. Hicks, Ian Morecroft, Sanbing Shen, John Sheward, Janet Colston, et al. 2004. « Overexpression of the 5-Hydroxytryptamine Transporter Gene: Effect on Pulmonary Hemodynamics and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 109 (17): 2150-55. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127375.56172.92.

Malmström, Johan, Henrik Lindberg, Claes Lindberg, Charlotte Bratt, Elisabet Wieslander, Eva-Lena Delander, Bengt Särnstrand, et al. 2004. « Transforming Growth Factor-Beta 1 Specifically Induce Proteins Involved in the Myofibroblast Contractile Apparatus ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 3 (5): 466-77. https://doi.org/10.1074/mcp.M300108-MCP200.

Mandegar, Mehran, Carmelle V. Remillard, et Jason X.-J. Yuan. 2002. « Ion Channels in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 45 (2): 81-114. https://doi.org/10.1053/pcad.2002.127491.

Mandegar, Mehran, et Jason X. -J Yuan. 2002. « Role of K+ Channels in Pulmonary Hypertension ». *Vascular Pharmacology* 38 (1): 25-33. https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00123-4.

Manoury, Boris, Caroline Lamalle, Roberta Oliveira, Joy Reid, et Alison M. Gurney. 2011. « Contractile and Electrophysiological Properties of Pulmonary Artery Smooth Muscle Are Not Altered in TASK-1 Knockout Mice ». *The Journal of Physiology* 589 (Pt 13): 3231-46. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.206748.

Marshall, Jeffrey D., Maor Sauler, Adriano Tonelli, Youlan Rao, Richard Bucala, Patty J. Lee, et Wassim H. Fares. 2017. « Complexity of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) and Other Angiogenic Biomarkers Profiling in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Pulmonary Circulation* 7 (3): 730-33. https://doi.org/10.1177/2045893217724141.

Martinsen, A, C Dessy, et N Morel. 2014. « Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase ». *Channels* 8 (5): 402-13. https://doi.org/10.4161/19336950.2014.950537.

Matsuoka, Tetsuro, Kenji Matsushita, Yusuke Katayama, Akikazu Fujita, Kiyoshi Inageda, Masayuki Tanemoto, Atsushi Inanobe, Shizuya Yamashita, Yuji Matsuzawa, et Yoshihisa Kurachi. 2000. « C-Terminal Tails of Sulfonylurea Receptors Control ADP-Induced Activation and Diazoxide Modulation of ATP-Sensitive K+ Channels ». *Circulation Research*, novembre. https://doi.org/10.1161/01.RES.87.10.873.

McClenaghan, Conor, Kel Vin Woo, et Colin G. Nichols. 2019. « Pulmonary Hypertension and ATP-sensitive Potassium Channels: Paradigms and Paradoxes ». *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 74 (1): 14-22. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12992.

McCormack, K., T. McCormack, M. Tanouye, B. Rudy, et W. Stühmer. 1995. « Alternative Splicing of the Human Shaker K+ Channel Beta 1 Gene and Functional Expression of the Beta 2 Gene Product ». *FEBS Letters* 370 (1-2): 32-36. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00785-8.

Mederos y Schnitzler, M., C. Derst, J. Daut, et R. Preisig-Müller. 2000. « ATP-Sensitive Potassium Channels in Capillaries Isolated from Guinea-Pig Heart ». *The Journal of Physiology* 525 Pt 2 (juin): 307-17. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00307.x.

Meloche, J., A. Pflieger, M. Vaillancourt, R. Paulin, F. Potus, S. Zervopoulos, C. Graydon, et al. 2014. « Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 129 (7): 786-97. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167.

Meloche, Jolyane, Marie Le Guen, François Potus, Jérôme Vinck, Benoit Ranchoux, Ian Johnson, Fabrice Antigny, et al. 2015. « miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension ». *APSselect* 2 (10): C363-72. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00149.2015@apsselect.2015.2.issue-10.

Michelakis, Evangelos D., M. Sean McMurtry, Xi-Chen Wu, Jason R.B. Dyck, Rohit Moudgil, Teresa A. Hopkins, Gary D. Lopaschuk, Lakshmi Puttagunta, Ross Waite, et Stephen L. Archer. 2002. « Dichloroacetate, a Metabolic Modulator, Prevents and Reverses Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats ». *Circulation* 105 (2): 244-50. https://doi.org/10.1161/hc0202.101974.

Molteni, A., W. F. Ward, C. H. Ts'ao, et N. H. Solliday. 1989. « Monocrotaline Pneumotoxicity in Mice ». *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 57 (3): 149-55. https://doi.org/10.1007/BF02899076.

Moncada, S., et A. Higgs. 1993. « The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway ». *The New England Journal of Medicine* 329 (27): 2002-12. https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706.

Mondejar-Parreño, Gema, María Callejo, Bianca Barreira, Daniel Morales-Cano, Sergio Esquivel-Ruiz, Marco Filice, Laura Moreno, Angel Cogolludo, et Francisco Perez-Vizcaino. 2019. « MiR-1 Induces Endothelial Dysfunction in Rat Pulmonary Arteries ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 75 (4): 519-29. https://doi.org/10.1007/s13105-019-00696-2.

Mondejar-Parreño, Gema, María Callejo, Bianca Barreira, Daniel Morales-Cano, Sergio Esquivel-Ruiz, Laura Moreno, Angel Cogolludo, et Francisco Perez-Vizcaino. 2019. « MiR-1 Is Increased in Pulmonary Hypertension and Downregulates Kv1.5 Channels in Rat Pulmonary Arteries ». *The Journal of Physiology* 597 (4): 1185-97. https://doi.org/10.1113/JP276054.

Mondéjar-Parreño, Gema, Javier Moral-Sanz, Bianca Barreira, Alicia De la Cruz, Teresa Gonzalez, Maria Callejo, Sergio Esquivel-Ruiz, et al. 2019. « Activation of Kv7 channels as a novel mechanism for NO/cGMP-induced pulmonary vasodilation ». *British Journal of Pharmacology* 176 (13): 2131-45. https://doi.org/10.1111/bph.14662.

Montani, David, Emmanuel Bergot, Sven Günther, Laurent Savale, Anne Bergeron, Arnaud Bourdin, Helene Bouvaist, et al. 2012. « Pulmonary Arterial Hypertension in Patients Treated by Dasatinib ». *Circulation* 125 (17): 2128-37. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079921.

Montani, David, Sven Günther, Peter Dorfmüller, Frédéric Perros, Barbara Girerd, Gilles Garcia, Xavier Jaïs, et al. 2013. « Pulmonary arterial hypertension ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (juillet): 97. https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-97.

Montani, David, Edmund M. Lau, Alexis Descatha, Xavier Jaïs, Laurent Savale, Pascal Andujar, Lynda Bensefa-Colas, et al. 2015. « Occupational Exposure to Organic Solvents: A Risk Factor for Pulmonary Veno-Occlusive Disease ». *European Respiratory Journal* 46 (6): 1721-31. https://doi.org/10.1183/13993003.00814-2015.

Montani, David, Edmund M. Lau, Peter Dorfmüller, Barbara Girerd, Xavier Jaïs, Laurent Savale, Frederic Perros, et al. 2016. « Pulmonary Veno-Occlusive Disease ». *European Respiratory Journal* 47 (5): 1518-34. https://doi.org/10.1183/13993003.00026-2016.

Morecroft, I, A Murray, M Nilsen, AM Gurney, et MR MacLean. 2009. « Treatment with the Kv7 potassium channel activator flupirtine is beneficial in two independent mouse models of pulmonary hypertension ». *British Journal of Pharmacology* 157 (7): 1241-49. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00283.x.

Morrell, Nicholas W., Micheala A. Aldred, Wendy K. Chung, C. Gregory Elliott, William C. Nichols, Florent Soubrier, Richard C. Trembath, et James E. Loyd. 2019. « Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension ». *The European Respiratory Journal* 53 (1). https://doi.org/10.1183/13993003.01899-2018.

Morrell, Nicholas W., Xudong Yang, Paul D. Upton, Karen B. Jourdan, Neal Morgan, Karen K. Sheares, et Richard C. Trembath. 2001. « Altered Growth Responses of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells From Patients With Primary Pulmonary Hypertension to Transforming Growth Factor-β1 and Bone Morphogenetic Proteins ». *Circulation* 104 (7): 790-95. https://doi.org/10.1161/hc3201.094152.

Movahed, Mohammad-Reza, Mehrtash Hashemzadeh, et M. Mazen Jamal. 2005. « The Prevalence of Pulmonary Embolism and Pulmonary Hypertension in Patients with Type II Diabetes Mellitus ». *Chest* 128 (5): 3568-71. https://doi.org/10.1378/chest.128.5.3568.

Mulvaney, Eamon P., Helen M. Reid, Lucia Bialesova, Annie Bouchard, Dany Salvail, et B. Therese Kinsella. 2020. « NTP42, a Novel Antagonist of the Thromboxane Receptor, Attenuates Experimentally

Induced Pulmonary Arterial Hypertension ». *BMC Pulmonary Medicine* 20 (1): 85. https://doi.org/10.1186/s12890-020-1113-2.

Mulvaney, Eamon P., Helen M. Reid, Lucia Bialesova, Pedro Mendes-Ferreira, Rui Adão, Carmen Brás-Silva, et B. Therese Kinsella. 2020. « Efficacy of the Thromboxane Receptor Antagonist NTP42 Alone, or in Combination with Sildenafil, in the Sugen/Hypoxia-Induced Model of Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Journal of Pharmacology* 889 (décembre): 173658. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173658.

Murray, Fiona, Margaret R. MacLean, et Nigel J. Pyne. 2002. « Increased Expression of the CGMP-Inhibited CAMP-Specific (PDE3) and CGMP Binding CGMP-Specific (PDE5) Phosphodiesterases in Models of Pulmonary Hypertension ». *British Journal of Pharmacology* 137 (8): 1187-94. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704984.

Nadaud, Sophie, Odette Poirier, Barbara Girerd, Catherine Blanc, David Montani, Mélanie Eyries, Françoise Imbert-Bismut, et al. 2013. « Small Platelet Microparticle Levels Are Increased in Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Journal of Clinical Investigation* 43 (1): 64-71. https://doi.org/10.1111/eci.12018.

Nagaraj, Chandran, Bi Tang, Zoltán Bálint, Malgorzata Wygrecka, Andelko Hrzenjak, Grazyna Kwapiszewska, Elvira Stacher, et al. 2013. « Src Tyrosine Kinase Is Crucial for Potassium Channel Function in Human Pulmonary Arteries ». *The European Respiratory Journal* 41 (1): 85-95. https://doi.org/10.1183/09031936.00211811.

Nagaraj, Chandran, Bi Tang, Bence M. Nagy, Rita Papp, Pritesh P. Jain, Leigh M. Marsh, Andrea L. Meredith, et al. 2016. « Docosahexaenoic acid causes rapid pulmonary arterial relaxation via KCa channel-mediated hyperpolarisation in pulmonary hypertension ». *The European respiratory journal* 48 (4): 1127-36. https://doi.org/10.1183/13993003.01814-2015.

Nagata, T., Y. Uehara, K. Hara, K. Igarashi, H. Hazama, T. Hisada, K. Kimura, A. Goto, et M. Omata. 1997. « Thromboxane Inhibition and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats ». *Respirology (Carlton, Vic.)* 2 (4): 283-89. https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.1997.tb00090.x.

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

Navas Tejedor, P., J. Tenorio Castaño, J. Palomino Doza, P. Arias Lajara, G. Gordo Trujillo, M. López Meseguer, A. Román Broto, P. Lapunzina Abadía, et P. Escribano Subía. 2017. « An Homozygous Mutation in KCNK3 Is Associated with an Aggressive Form of Hereditary Pulmonary Arterial Hypertension ». *Clinical Genetics* 91 (3): 453-57. https://doi.org/10.1111/cge.12869.

Nesti, Edmund, Brian Everill, et Anthony D. Morielli. 2004. « Endocytosis as a Mechanism for Tyrosine Kinase-Dependent Suppression of a Voltage-Gated Potassium Channel ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (9): 4073-88. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0788.

Nichols, Colin G., Gautam K. Singh, et Dorothy K. Grange. 2013. « KATP channels and cardiovascular disease: Suddenly a syndrome ». *Circulation research* 112 (7): 1059-72. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300514.

Ohnishi, Yuji, Seigo Okada, Hiroki Yasudo, Sasagu Kimura, Yasuo Suzuki, et Shunji Hasegawa. 2020. « Pulmonary Hypertension Following Increased Dosing of Diazoxide in an Infant ». *International Heart Journal* 61 (5): 1084-87. https://doi.org/10.1536/ihj.20-024.

Olschewski, Andrea, Yingji Li, Bi Tang, Jörg Hanze, Bastian Eul, Rainer M. Bohle, Jochen Wilhelm, et al. 2006. « Impact of TASK-1 in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *Circulation Research* 98 (8): 1072-80. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000219677.12988.e9.

Olschewski, Horst, Gerald Simonneau, Nazzareno Galiè, Timothy Higenbottam, Robert Naeije, Lewis J. Rubin, Sylvia Nikkho, et al. 2002. « Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 347 (5): 322-29. https://doi.org/10.1056/NEJMoa020204.

Oudiz, Ronald, Colin Meyer, Melanie Chin, Jeremy Feldman, Angie Goldsberry, John Mc Connell, Peter McCullough, et al. 2015. « Initial Data Report from "LARIAT": A Phase 2 Study of Bardoxolone Methyl in PAH Patients on Stable Background Therapy ». *Chest* 148 (4): 639A. https://doi.org/10.1378/chest.2345856.

Papp, Rita, Chandran Nagaraj, Diana Zabini, Bence M. Nagy, Miklós Lengyel, Davor Skofic Maurer, Neha Sharma, et al. 2019. « Targeting TMEM16A to Reverse Vasoconstriction and Remodelling in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Respiratory Journal* 53 (6). https://doi.org/10.1183/13993003.00965-2018.

Parikh, V.N., R.C. Jin, S. Rabello, N. Gulbahce, K. White, A. Hale, K.A. Cottrill, et al. 2012. « MicroRNA-21 Integrates Pathogenic Signaling to Control Pulmonary Hypertension: Results of a Network Bioinformatics Approach ». *Circulation* 125 (12): 1520-32. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060269.

Park, Won Sun, Jin Han, et Yung E. Earm. 2008. « Physiological Role of Inward Rectifier K(+) Channels in Vascular Smooth Muscle Cells ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 457 (1): 137-47. https://doi.org/10.1007/s00424-008-0512-7.

Paulin, Roxane, Jolyane Meloche, Audrey Courboulin, Caroline Lambert, Alois Haromy, Antony Courchesne, Pierre Bonnet, Steeve Provencher, Evangelos D. Michelakis, et Sébastien Bonnet. 2014. « Targeting Cell Motility in Pulmonary Arterial Hypertension ». *European Respiratory Journal* 43 (2): 531-44. https://doi.org/10.1183/09031936.00181312.

Perros, F., P. Dorfmüller, R. Souza, I. Durand-Gasselin, S. Mussot, M. Mazmanian, P. Hervé, D. Emilie, G. Simonneau, et M. Humbert. 2007. « Dendritic Cell Recruitment in Lesions of Human and Experimental Pulmonary Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 29 (3): 462-68. https://doi.org/10.1183/09031936.00094706.

Perros, Frédéric, Sven Günther, Benoit Ranchoux, Laurent Godinas, Fabrice Antigny, Marie-Camille Chaumais, Peter Dorfmüller, et al. 2015. « Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models ». *Circulation* 132 (9): 834-47. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.014207.

Perros, Frédéric, David Montani, Peter Dorfmüller, Ingrid Durand-Gasselin, Colas Tcherakian, Jérôme Le Pavec, Michel Mazmanian, et al. 2008. « Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (1): 81-88. https://doi.org/10.1164/rccm.200707-1037OC.

Picken, Christina, Konstantinos C. Fragkos, Mohammad Eddama, Gerry Coghlan, et Lucie H. Clapp. 2019. « Adverse Events of Prostacyclin Mimetics in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Medicine* 8 (4): 481. https://doi.org/10.3390/jcm8040481.

Pietra, Giuseppe G., Frederique Capron, Susan Stewart, Ornella Leone, Marc Humbert, Ivan M. Robbins, Lynne M. Reid, et R. M. Tuder. 2004. « Pathologic Assessment of Vasculopathies in Pulmonary Hypertension ». *Journal of the American College of Cardiology* 43 (12 Suppl S): 25S-32S. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.02.033.

Ponte, Cristiano G., Owen B. McManus, William A. Schmalhofer, Dong-Ming Shen, Ge Dai, Andra Stevenson, Sylvie Sur, et al. 2012. « Selective, Direct Activation of High-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels Causes Smooth Muscle Relaxation ». *Molecular Pharmacology* 81 (4): 567-77. https://doi.org/10.1124/mol.111.075853.

Pozeg, Zlatko I., Evangelos D. Michelakis, M. Sean McMurtry, Bernard Thébaud, Xi-Chen Wu, Jason R.B. Dyck, Kyoko Hashimoto, et al. 2003. « In Vivo Gene Transfer of the O2-Sensitive Potassium Channel Kv1.5 Reduces Pulmonary Hypertension and Restores Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Chronically Hypoxic Rats ». *Circulation* 107 (15): 2037-44. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000062688.76508.B3.

Prost, Anne-Lise, Alain Bloc, Nicolas Hussy, Renaud Derand, et Michel Vivaudou. 2004. « Zinc is both an intracellular and extracellular regulator of KATP channel function ». *The Journal of Physiology* 559 (Pt 1): 157-67. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065094.

Pulido, Tomás, Igor Adzerikho, Richard N. Channick, Marion Delcroix, Nazzareno Galiè, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Pavel Jansa, et al. 2013. « Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 369 (9): 809-18. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213917.

Pullamsetti, S.S., C. Doebele, A. Fischer, R. Savai, B. Kojonazarov, B.K. Dahal, H.A. Ghofrani, et al. 2012. « Inhibition of MicroRNA-17 Improves Lung and Heart Function in Experimental Pulmonary

Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185 (4): 409-19. https://doi.org/10.1164/rccm.201106-1093OC.

Qu, Lihui, Lei Yu, Yanli Wang, Xin Jin, Qianlong Zhang, Ping Lu, Xiufeng Yu, et al. 2015. « Inward Rectifier K+ Currents Are Regulated by CaMKII in Endothelial Cells of Primarily Cultured Bovine Pulmonary Arteries ». *PLoS ONE* 10 (12): e0145508. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145508.

Quayle, J. M., J. G. McCarron, J. E. Brayden, et M. T. Nelson. 1993. « Inward rectifier K+ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 265 (5): C1363-70. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.5.C1363.

Quayle, J. M., M. R. Turner, H. E. Burrell, et T. Kamishima. 2006. « Effects of Hypoxia, Anoxia, and Metabolic Inhibitors on KATP Channels in Rat Femoral Artery Myocytes ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (1): H71-80. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01107.2005.

Rai, Nabham, Mazen Shihan, Werner Seeger, Ralph T. Schermuly, et Tatyana Novoyatleva. 2021. « Genetic Delivery and Gene Therapy in Pulmonary Hypertension ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1179. https://doi.org/10.3390/ijms22031179.

Ranchoux, Benoît, Fabrice Antigny, Catherine Rucker-Martin, Aurélie Hautefort, Christine Péchoux, Harm Jan Bogaard, Peter Dorfmüller, et al. 2015. « Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 131 (11): 1006-18. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750.

Ranchoux, Benoît, Sven Günther, Rozenn Quarck, Marie-Camille Chaumais, Peter Dorfmüller, Fabrice Antigny, Sébastien J. Dumas, et al. 2015. « Chemotherapy-Induced Pulmonary Hypertension: Role of Alkylating Agents ». *The American Journal of Pathology* 185 (2): 356-71. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.021.

Ratjen, Felix. 2016. « Pulmonary Artery Hypertension: An Underrated Disease Manifestation in Cystic Fibrosis? » *The Lancet. Respiratory Medicine* 4 (8): 596-98. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30107-2.

Remillard, Carmelle V., Donna D. Tigno, Oleksandr Platoshyn, Elyssa D. Burg, Elena E. Brevnova, Diane Conger, Ann Nicholson, et al. 2007. « Function of Kv1.5 Channels and Genetic Variations of KCNA5 in Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 292 (5): C1837-1853. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00405.2006.

Ribeiro Baptista, Bruno, Nadine Petitpain, Emmanuel Gomez, Melissa Yelehé-Okouma, Simon Valentin, Anne Guillaumot, François Chabot, et Ari Chaouat. 2019. « Pulmonary Arterial Hypertension in Patient Treated for Multiple Sclerosis with 4-Aminopyridine ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 33 (1): 127-29. https://doi.org/10.1111/fcp.12396.

Ribeiro-Silva, J.C., A.A. Miyakawa, et Jose E. Krieger. 2021. « Focal adhesion signaling: vascular smooth muscle cell contractility beyond calcium mechanisms ». *Clinical Science* 135 (9): 1189-1207. https://doi.org/10.1042/CS20201528.

Ricard, Nicolas, Ly Tu, Morane Le Hiress, Alice Huertas, Carole Phan, Raphaël Thuillet, Caroline Sattler, et al. 2014. « Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle–Like Cells in Pulmonary Hypertension ». *Circulation*, avril. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469.

Robert, R., J.-P. Savineau, C. Norez, F. Becq, et C. Guibert. 2007. « Expression and Function of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Rat Intrapulmonary Arteries ». *European Respiratory Journal* 30 (5): 857-64. https://doi.org/10.1183/09031936.00060007.

Roth, R. A., L. A. Dotzlaf, B. Baranyi, C. H. Kuo, et J. B. Hook. 1981. « Effect of Monocrotaline Ingestion on Liver, Kidney, and Lung of Rats ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 60 (2): 193-203. https://doi.org/10.1016/0041-008x(91)90223-2.

Rothman, Alexander M. K., Nadine D. Arnold, Josephine A. Pickworth, James Iremonger, Loredana Ciuclan, Robert M. H. Allen, Sabine Guth-Gundel, et al. 2016. « MicroRNA-140-5p and SMURF1 Regulate Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (7): 2495-2508. https://doi.org/10.1172/JCI83361.

Rubin, L. J., J. Mendoza, M. Hood, M. McGoon, R. Barst, W. B. Williams, J. H. Diehl, J. Crow, et W. Long. 1990. « Treatment of Primary Pulmonary Hypertension with Continuous Intravenous Prostacyclin

(Epoprostenol). Results of a Randomized Trial ». *Annals of Internal Medicine* 112 (7): 485-91. https://doi.org/10.7326/0003-4819-112-7-485.

Rubin, Lewis J., David B. Badesch, Robyn J. Barst, Nazzareno Galie, Carol M. Black, Anne Keogh, Tomas Pulido, et al. 2002. « Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The New England Journal of Medicine* 346 (12): 896-903. https://doi.org/10.1056/NEJMoa012212.

Rubin, Lewis J., David B. Badesch, Robyn J. Barst, Nazzareno Galiè, Carol M. Black, Anne Keogh, Tomas Pulido, et al. 2009. « Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension ». Research-article. Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa012212. Massachusetts Medical Society. World. 7 octobre 2009. https://doi.org/10.1056/NEJMoa012212.

Ruffenach, Grégoire, Sophie Chabot, Virginie F. Tanguay, Audrey Courboulin, Olivier Boucherat, Francois Potus, Jolyane Meloche, et al. 2016. « Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 194 (10): 1273-85. https://doi.org/10.1164/rccm.201512-2380OC.

Sahoo, Sanghamitra, Daniel N. Meijles, Imad Al Ghouleh, Manuj Tandon, Eugenia Cifuentes-Pagano, John Sembrat, Mauricio Rojas, Elena Goncharova, et Patrick J. Pagano. 2016. « MEF2C-MYOCD and Leiomodin1 Suppression by MiRNA-214 Promotes Smooth Muscle Cell Phenotype Switching in Pulmonary Arterial Hypertension ». *PLOS ONE* 11 (5): e0153780. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153780.

Sakao, Seiichiro, Laimute Taraseviciene-Stewart, Jong Deog Lee, Kathy Wood, Carlyne D. Cool, et Norbert F. Voelkel. 2005. « Initial Apoptosis Is Followed by Increased Proliferation of Apoptosis-Resistant Endothelial Cells ». *The FASEB Journal* 19 (9): 1178-80. https://doi.org/10.1096/fj.04-3261fje.

Sakao, Seiichiro, Koichiro Tatsumi, et Norbert F Voelkel. 2009. « Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation ». *Respiratory Research* 10 (1): 95. https://doi.org/10.1186/1465-9921-10-95.

Satoh, E., M. Yamada, C. Kondo, V. P. Repunte, Y. Horio, T. Iijima, et Y. Kurachi. 1998. « Intracellular Nucleotide-Mediated Gating of SUR/Kir6.0 Complex Potassium Channels Expressed in a Mammalian Cell Line and Its Modification by Pinacidil ». *The Journal of Physiology* 511 (Pt 3) (septembre): 663-74. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.663bg.x.

Sausbier, M., R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth, et F. Hofmann. 2000. « Mechanisms of NO/CGMP-Dependent Vasorelaxation ». *Circulation Research* 87 (9): 825-30. https://doi.org/10.1161/01.res.87.9.825.

Schermuly, Ralph Theo, Eva Dony, Hossein Ardeschir Ghofrani, Soni Pullamsetti, Rajkumar Savai, Markus Roth, Akylbek Sydykov, et al. 2005. « Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (10): 2811-21. https://doi.org/10.1172/JCI24838.

Schewe, Marcus, Ehsan Nematian-Ardestani, Han Sun, Marianne Musinszki, Sönke Cordeiro, Giovanna Bucci, Bert L. de Groot, Stephen J. Tucker, Markus Rapedius, et Thomas Baukrowitz. 2016. « A Non-canonical Voltage-Sensing Mechanism Controls Gating in K2P K+ Channels ». *Cell* 164 (5): 937-49. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.002.

Sedivy, Vojtech, Shreena Joshi, Youssef Ghaly, Roman Mizera, Marie Zaloudikova, Sean Brennan, Jana Novotna, Jan Herget, et Alison M. Gurney. 2015. « Role of Kv7 channels in responses of the pulmonary circulation to hypoxia ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 308 (1): L48-57. https://doi.org/10.1152/ajplung.00362.2013.

Sheikh, Abdul Q., Ashish Misra, Ivan O. Rosas, Ralf H. Adams, et Daniel M. Greif. 2015. « Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension ». *Science translational medicine* 7 (308): 308ra159. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9712.

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

Shi-Wen, Xu, Yunliang Chen, Christopher P. Denton, Mark Eastwood, Elisabetta A. Renzoni, George Bou-Gharios, Jeremy D. Pearson, et al. 2004. « Endothelin-1 Promotes Myofibroblast Induction through the ETA Receptor via a Rac/Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-Dependent Pathway and Is Essential for the Enhanced Contractile Phenotype of Fibrotic Fibroblasts ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (6): 2707-19. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0902.

Simonneau, Gérald, David Montani, David S. Celermajer, Christopher P. Denton, Michael A. Gatzoulis, Michael Krowka, Paul G. Williams, et Rogerio Souza. 2019. « Haemodynamic Definitions and Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 53 (1). https://doi.org/10.1183/13993003.01913-2018.

Sitapara, Ravikumar, Chuluunbaatar Sugarragchaa, et Lawrence S. Zisman. 2021. « SU5416 plus hypoxia but not selective VEGFR2 inhibition with cabozantinib plus hypoxia induces pulmonary hypertension in rats: potential role of BMPR2 signaling ». *Pulmonary Circulation* 11 (3): 20458940211021530. https://doi.org/10.1177/20458940211021528.

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

Sitbon, Olivier, Marc Humbert, Xavier Jaïs, Vincent Ioos, Abdul M. Hamid, Steeve Provencher, Gilles Garcia, Florence Parent, Philippe Hervé, et Gérald Simonneau. 2005. « Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 111 (23): 3105-11. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.488486.

Skofic Maurer, Davor, Diana Zabini, Chandran Nagaraj, Neha Sharma, Miklós Lengyel, Bence M. Nagy, Saša Frank, et al. 2020. « Endothelial Dysfunction Following Enhanced TMEM16A Activity in Human Pulmonary Arteries ». *Cells* 9 (9): 1984. https://doi.org/10.3390/cells9091984.

Smith, Pamela D, Suzanne E Brett, Kevin D Luykenaar, Shaun L Sandow, Sean P Marrelli, Edward J Vigmond, et Donald G Welsh. 2008. « KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle ». *The Journal of Physiology* 586 (Pt 4): 1147-60. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145474.

Soon, Elaine, Alan M. Holmes, Carmen M. Treacy, Natalie J. Doughty, Laura Southgate, Rajiv D. Machado, Richard C. Trembath, et al. 2010. « Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension ». *Circulation* 122 (9): 920-27. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933762.

Spiekerkoetter, Edda, Yon K. Sung, Deepti Sudheendra, Valerie Scott, Patricia Del Rosario, Matthew Bill, Francois Haddad, Janel Long-Boyle, Haley Hedlin, et Roham T. Zamanian. 2017. « Randomised Placebo-Controlled Safety and Tolerability Trial of FK506 (Tacrolimus) for Pulmonary Arterial Hypertension ». *The European Respiratory Journal* 50 (3): 1602449. https://doi.org/10.1183/13993003.02449-2016.

Spiekerkoetter, Edda, Xuefei Tian, Jie Cai, Rachel K. Hopper, Deepti Sudheendra, Caiyun G. Li, Nesrine El-Bizri, et al. 2013. « FK506 Activates BMPR2, Rescues Endothelial Dysfunction, and Reverses Pulmonary Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (8): 3600-3613. https://doi.org/10.1172/JCI65592.

Standen, Nicholas B., John M. Quayle, Noel W. Davies, Joseph E. Brayden, Yu Huang, et Mark T. Nelson. 1989. « Hyperpolarizing Vasodilators Activate ATP-Sensitive K+ Channels in Arterial Smooth Muscle ». *Science*, juillet. https://doi.org/10.1126/science.2501869.

Steiner, M Kathryn, Olga L Syrkina, Narasaish Kolliputi, Eugene J Mark, Charles A Hales, et Aaron B Waxman. 2009. « IL-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension ». *Circulation research* 104 (2): 236-44. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182014.

Stenmark, Kurt R., Michael E. Yeager, Karim C. El Kasmi, Eva Nozik-Grayck, Evgenia V. Gerasimovskaya, Min Li, Suzette R. Riddle, et Maria G. Frid. 2013. « The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function ». *Annual review of physiology* 75: 23-47. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802.

Streit, Anne K., Michael F. Netter, Franca Kempf, Magdalena Walecki, Susanne Rinné, Murali K. Bollepalli, Regina Preisig-Müller, et al. 2011. « A Specific Two-pore Domain Potassium Channel Blocker Defines the Structure of the TASK-1 Open Pore ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (16): 13977-84. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227884.

Sysol, Justin R., Jiwang Chen, Sunit Singla, Shuangping Zhao, Suzy Comhair, Viswanathan Natarajan, et Roberto F. Machado. 2018. « Micro-RNA-1 is decreased by hypoxia and contributes to the development of pulmonary vascular remodeling via regulation of sphingosine kinase 1 ».

American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 314 (3): L461-72. https://doi.org/10.1152/ajplung.00057.2017.

Sztuka, Katarzyna, et Magdalena Jasińska-Stroschein. 2017. « Animal Models of Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of Data from 6126 Animals ». *Pharmacological Research* 125 (Pt B): 201-14. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.003.

Tabeling, Christoph, Hanpo Yu, Liming Wang, Hannes Ranke, Neil M. Goldenberg, Diana Zabini, Elena Noe, et al. 2015. « CFTR and Sphingolipids Mediate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (13): E1614-1623. https://doi.org/10.1073/pnas.1421190112.

Tajsic, Tamara, et Nicholas W. Morrell. 2011. « Smooth Muscle Cell Hypertrophy, Proliferation, Migration and Apoptosis in Pulmonary Hypertension ». *Comprehensive Physiology* 1 (1): 295-317. https://doi.org/10.1002/cphy.c100026.

Talley, Edmund M, Qiubo Lei, Jay E Sirois, et Douglas A Bayliss. 2000. « TASK-1, a Two–Pore Domain K+ Channel, Is Modulated by Multiple Neurotransmitters in Motoneurons ». *Neuron* 25 (2): 399-410. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80903-4.

Tamura, Yuichi, Carole Phan, Ly Tu, Morane Le Hiress, Raphaël Thuillet, Etienne-Marie Jutant, Elie Fadel, et al. 2018. « Ectopic Upregulation of Membrane-Bound IL6R Drives Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (5): 1956-70. https://doi.org/10.1172/JCI96462.

Tang, Bi, Yingji Li, Chandran Nagaraj, Rory E. Morty, Sabine Gabor, Elvira Stacher, Robert Voswinckel, et al. 2009. « Endothelin-1 Inhibits Background Two-Pore Domain Channel TASK-1 in Primary Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41 (4): 476-83. https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0412OC.

Tanner, F. C., P. Meier, H. Greutert, C. Champion, E. G. Nabel, et T. F. Lüscher. 2000. « Nitric Oxide Modulates Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins: A Cytostatic Strategy for Inhibition of Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation ». *Circulation* 101 (16): 1982-89. https://doi.org/10.1161/01.cir.101.16.1982.

Taraseviciene-Stewart, Laimute, Yasunori Kasahara, Lori Alger, Peter Hirth, Gerald Mc Mahon, Johannes Waltenberger, Norbert F. Voelkel, et Rubin M. Tuder. 2001. « Inhibition of the VEGF Receptor 2 Combined with Chronic Hypoxia Causes Cell Death-Dependent Pulmonary Endothelial Cell Proliferation and Severe Pulmonary Hypertension ». *The FASEB Journal* 15 (2): 427-38. https://doi.org/10.1096/fj.00-0343com.

Tennant, Brian P., Yi Cui, Andrew Tinker, et Lucie H. Clapp. 2006. « Functional expression of inward rectifier potassium channels in cultured human pulmonary smooth muscle cells ». *The Journal of membrane biology* 213 (1): 19-29. https://doi.org/10.1007/s00232-006-0037-y.

Tielemans, Birger, Marion Delcroix, Catharina Belge, et Rozenn Quarck. 2019. « TGFβ and BMPRII Signalling Pathways in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Drug Discovery Today* 24 (3): 703-16. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.12.001.

Toshner, Mark, Colin Church, Lars Harbaum, Christopher Rhodes, Sofia S. Villar Moreschi, James Liley, Rowena Jones, et al. 2021. « Mendelian Randomisation and Experimental Medicine Approaches to IL-6 as a Drug Target in PAH ». *The European Respiratory Journal*, septembre, 2002463. https://doi.org/10.1183/13993003.02463-2020.

Toshner, Mark, Robert Voswinckel, Mark Southwood, Rafia Al-Lamki, Luke S. G. Howard, Denis Marchesan, Jun Yang, et al. 2009. « Evidence of Dysfunction of Endothelial Progenitors in Pulmonary Arterial Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (8): 780-87. https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1662OC.

Totani, Licia, Roberto Plebani, Antonio Piccoli, Sara Di Silvestre, Paola Lanuti, Antonio Recchiuti, Eleonora Cianci, et al. 2017. « Mechanisms of Endothelial Cell Dysfunction in Cystic Fibrosis ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (12): 3243-53. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.011.

Toyoda, Hiroki, Mitsuru Saito, Makoto Okazawa, Keiko Hirao, Hajime Sato, Haruka Abe, Kenji Takada, et al. 2010. « Protein Kinase G Dynamically Modulates TASK1-Mediated Leak K+ Currents in Cholinergic Neurons of the Basal Forebrain ». *Journal of Neuroscience* 30 (16): 5677-89. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5407-09.2010.

Tuder, R. M., C. D. Cool, M. W. Geraci, J. Wang, S. H. Abman, L. Wright, D. Badesch, et N. F. Voelkel. 1999. « Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159 (6): 1925-32. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.6.9804054.

Tuder, R M, B E Flook, et N F Voelkel. 1995. « Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. » *Journal of Clinical Investigation* 95 (4): 1798-1807.

Tuder, R. M., B. Groves, D. B. Badesch, et N. F. Voelkel. 1994. « Exuberant Endothelial Cell Growth and Elements of Inflammation Are Present in Plexiform Lesions of Pulmonary Hypertension ». *The American Journal of Pathology* 144 (2): 275-85.

Ueda, K., N. Inagaki, et S. Seino. 1997. « MgADP Antagonism to Mg2+-Independent ATP Binding of the Sulfonylurea Receptor SUR1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (37): 22983-86. https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.22983.

Vang, Alexander, Jeffrey Mazer, Brian Casserly, et Gaurav Choudhary. 2010. « Activation of Endothelial BKCa Channels Causes Pulmonary Vasodilation ». *Vascular Pharmacology* 53 (3-4): 122-29. https://doi.org/10.1016/j.vph.2010.05.001.

Wallace, Emma, Nicholas W. Morrell, Xudong D. Yang, Lu Long, Hannah Stevens, Margaret Nilsen, Lynn Loughlin, Kirsty M. Mair, Andrew H. Baker, et Margaret R. MacLean. 2015. « A Sex-Specific MicroRNA-96/5-Hydroxytryptamine 1B Axis Influences Development of Pulmonary Hypertension ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191 (12): 1432-42. https://doi.org/10.1164/rccm.201412-2148OC.

Wang, Guoliang, Rui Fan, Ruirui Ji, Wenxin Zou, Daniel J. Penny, Nidhy P. Varghese, et Yuxin Fan. 2016. « Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report ». *BMC Pulmonary Medicine* 16 (janvier): 17. https://doi.org/10.1186/s12890-016-0183-7.

Wang, T., Y. Li, J. Chen, L. Xie, et T. Xiao. 2018. « TGF-β1/Smad3 signaling promotes collagen synthesis in pulmonary artery smooth muscle by down-regulating miR-29b ». *Int J Clin Exp Pathol* 11 (12): 5592-5601.

Weatherald, Jason, Marie-Camille Chaumais, et David Montani. 2017. « Pulmonary Arterial Hypertension Induced by Tyrosine Kinase Inhibitors ». *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 23 (5): 392-97. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000412.

Weatherald, Jason, Marie-Camille Chaumais, Laurent Savale, Xavier Jaïs, Andrei Seferian, Matthieu Canuet, Hélène Bouvaist, et al. 2017. « Long-Term Outcomes of Dasatinib-Induced Pulmonary Arterial Hypertension: A Population-Based Study ». *The European Respiratory Journal* 50 (1): 1700217. https://doi.org/10.1183/13993003.00217-2017.

Welch, Carrie L., et Wendy K. Chung. 2022. « Channelopathy Genes in Pulmonary Arterial Hypertension ». *Biomolecules* 12 (2): 265. https://doi.org/10.3390/biom12020265.

West, James, et Anna Hemnes. 2011. « Experimental and Transgenic Models of Pulmonary Hypertension ». *Comprehensive Physiology* 1 (2): 769-82. https://doi.org/10.1002/cphy.c100003.

Wharton, John, Julian W. Strange, Gigi M. O. Møller, Ellena J. Growcott, Xiaohui Ren, Angela P. Franklyn, Stephen C. Phillips, et Martin R. Wilkins. 2005. « Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (1): 105-13. https://doi.org/10.1164/rccm.200411-1587OC.

Whitman, E. Miles, Sarah Pisarcik, Trevor Luke, Michele Fallon, Jian Wang, J. T. Sylvester, Gregg L. Semenza, et Larissa A. Shimoda. 2008. « Endothelin-1 Mediates Hypoxia-Induced Inhibition of Voltage-Gated K+ Channel Expression in Pulmonary Arterial Myocytes ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 294 (2): L309-318. https://doi.org/10.1152/ajplung.00091.2007.

Wipff, J., P. Dieudé, M. Guedj, B. Ruiz, G. Riemekasten, J. L. Cracowski, M. Matucci-Cerinic, et al. 2010. « Association of a KCNA5 Gene Polymorphism with Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension in the European Caucasian Population ». *Arthritis and Rheumatism* 62 (10): 3093-3100. https://doi.org/10.1002/art.27607.

Woo, Seung Kyoon, Natalia Tsymbalyuk, Orest Tsymbalyuk, Svetlana Ivanova, Volodymyr Gerzanich, et J. Marc Simard. 2020. « SUR1-TRPM4 Channels, Not KATP, Mediate Brain Swelling Following

Cerebral Ischemia ». *Neuroscience Letters* 718 (janvier): 134729. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134729.

Xing, Xi-Qian, Bo Li, Shuang-Lan Xu, Jie Liu, Chun-Fang Zhang, et Jiao Yang. 2019. « MicroRNA-214-3p Regulates Hypoxia-Mediated Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Targeting ARHGEF12 ». *Medical Science Monitor* 25 (août): 5738-46. https://doi.org/10.12659/MSM.915709.

Yamamoto, Akihito, Hideki Takahashi, Yuko Kojima, Yasunari Tsuda, Yoshiteru Morio, Masashi Muramatsu, et Yoshinosuke Fukuchi. 2008. « Downregulation of Angiopoietin-1 and Tie2 in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension ». *Respiration* 75 (3): 328-38. https://doi.org/10.1159/000112432.

Yang, Shanzhong, Sami Banerjee, Andressa de Freitas, Huachun Cui, Na Xie, Edward Abraham, et Gang Liu. 2012. « MiR-21 Regulates Chronic Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 302 (6): L521-529. https://doi.org/10.1152/ajplung.00316.2011.

Yang, Xiao-Ru, Mo-Jun Lin, Lionel S. McIntosh, et James S. K. Sham. 2006. « Functional Expression of Transient Receptor Potential Melastatin- and Vanilloid-Related Channels in Pulmonary Arterial and Aortic Smooth Muscle ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (6): L1267-1276. https://doi.org/10.1152/ajplung.00515.2005.

Yoshida, Hidetada, Jonathan E. Feig, Alison Morrissey, Ioana A. Ghiu, Michael Artman, et William A. Coetzee. 2004. « K ATP Channels of Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells Consist of a Heteromultimeric Complex of Kir6.1, Kir6.2, and SUR2B Subunits ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 37 (4): 857-69. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.05.022.

Young, Katharine A., Charles Ivester, James West, Michelle Carr, et David M. Rodman. 2006. « BMP Signaling Controls PASMC KV Channel Expression in Vitro and in Vivo ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (5): L841-848. https://doi.org/10.1152/ajplung.00158.2005.

Yu, Ying, Michele Sweeney, Shen Zhang, Oleksandr Platoshyn, Judd Landsberg, Abraham Rothman, et Jason X.-J. Yuan. 2003. « PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284 (2): C316-30. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00125.2002.

Yuan, Jason Xiao-Jian, Ann M. Aldinger, Magdalena Juhaszova, Jian Wang, John V. Conte, Sean P. Gaine, Jonathan B. Orens, et Lewis J. Rubin. 1998. « Dysfunctional Voltage-Gated K+ Channels in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Patients With Primary Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 98 (14): 1400-1406. https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.14.1400.

Yuan, Xiao-Jian. 1995. « Voltage-Gated K+ Currents Regulate Resting Membrane Potential and [Ca2+]i in Pulmonary Arterial Myocytes ». *Circulation Research* 77 (2): 370-78. https://doi.org/10.1161/01.RES.77.2.370.

Yuan, Xiao-Jian, Jian Wang, Magdalena Juhaszova, Sean P Gaine, et Lewis J Rubin. 1998. « Attenuated K+ Channel Gene Transcription in Primary Pulmonary Hypertension ». *The Lancet* 351 (9104): 726-27. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)78495-6.

Yuan, Xiao-Jian, Jian Wang, Magdalena Juhaszova, Vera A. Golovina, et Lewis J. Rubin. 1998. « Molecular Basis and Function of Voltage-Gated K^+ Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 274 (4): L621-35. https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.4.L621.

Zeng, Y., X. Zhang, K. Kang, J. Chen, Z. Wu, J. Huang, W. Lu, et al. 2016. « MicroRNA-223 Attenuates Hypoxia-Induced Vascular Remodeling by Targeting RhoB/MLC2 in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells ». *Scientific Reports* 6. https://doi.org/10.1038/srep24900.

Zhang, Hong-Sheng, Qian Liu, Chun-Mei Piao, Yan Zhu, Qiang-Qiang Li, Jie Du, et Hong Gu. 2019. « Genotypes and Phenotypes of Chinese Pediatric Patients With Idiopathic and Heritable Pulmonary Arterial Hypertension-A Single-Center Study ». *The Canadian Journal of Cardiology* 35 (12): 1851-56. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.07.628.

Zhang, Qian, Chengwu Li, Ting Zhang, Yaping Ge, Xiaojuan Han, Sifan Sun, Jianhua Ding, Ming Lu, et Gang Hu. 2018. « Deletion of Kir6.2/SUR1 Potassium Channels Rescues Diminishing of DA Neurons via

Decreasing Iron Accumulation in PD ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 92 (octobre): 164-76. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.08.006.

Zhang, Yanwei, et Jing Xu. 2016. « MiR-140-5p Regulates Hypoxia-Mediated Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation, Apoptosis and Differentiation by Targeting Dnmt1 and Promoting SOD2 Expression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473 (1): 342-48. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.116.

Zhao, You-Yang, Yidan D. Zhao, Muhammad K. Mirza, Julia H. Huang, Hari-Hara S. K. Potula, Steven M. Vogel, Viktor Brovkovych, Jason X.-J. Yuan, John Wharton, et Asrar B. Malik. 2009. « Persistent ENOS Activation Secondary to Caveolin-1 Deficiency Induces Pulmonary Hypertension in Mice and Humans through PKG Nitration ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 2009-18. https://doi.org/10.1172/JCI33338.

Zhou, Ming, Hui-Jing He, Osamu Tanaka, Masaki Sekiguchi, Katsumasa Kawahara, et Hiroshi Abe. 2012. « Localization of the ATP-Sensitive K(+) Channel Regulatory Subunits SUR2A and SUR2B in the Rat Brain ». *Neuroscience Research* 74 (2): 91-105. https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.08.005.

Zhu, Boqian, Yaoyao Gong, Gaoliang Yan, Dong Wang, Yong Qiao, Qingjie Wang, Bo Liu, Jiantong Hou, Ruifeng Li, et Chengchun Tang. 2018. « Down-Regulation of LncRNA MEG3 Promotes Hypoxia-Induced Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration via Repressing PTEN by Sponging MiR-21 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (3): 2125-32. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.185.

Zhu, Na, Claudia Gonzaga-Jauregui, Carrie L. Welch, Lijiang Ma, Hongjian Qi, Alejandra K. King, Usha Krishnan, et al. 2018. « Exome Sequencing in Children With Pulmonary Arterial Hypertension Demonstrates Differences Compared With Adults ». *Circulation: Genomic and Precision Medicine* 11 (4): e001887. https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.001887.

Zhu, Na, Carrie L. Welch, Jiayao Wang, Philip M. Allen, Claudia Gonzaga-Jauregui, Lijiang Ma, Alejandra K. King, et al. 2018. « Rare variants in SOX17 are associated with pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease ». *Genome Medicine* 10 (juillet): 56. https://doi.org/10.1186/s13073-018-0566-x.

Zhu, Rong, Li-Qing Bi, Su-Ling Wu, Lan Li, Hui Kong, Wei-Ping Xie, Hong Wang, et Zi-Li Meng. 2015. « Iptakalim attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats by endothelial function protection ». *Molecular Medicine Reports* 12 (2): 2945-52. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3695.

Zhu, Tian-Tian, Wei-Fang Zhang, Ya-Ling Yin, Yu-Hao Liu, Ping Song, Jian Xu, Ming-Xiang Zhang, et Peng Li. 2019. « MicroRNA-140-5p Targeting Tumor Necrosis Factor-α Prevents Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (6): 9535-50. https://doi.org/10.1002/jcp.27642.

Zhu, Yuming, Shijiang Zhang, Weiping Xie, Qingling Li, Yanjuan Zhou, et Hong Wang. 2008. « Iptakalim Inhibited Endothelin-1-Induced Proliferation of Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells through the Activation of KATP Channel ». *Vascular Pharmacology* 48 (2): 92-99. https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.01.001.

Zolty, Ronald. 2021. « Novel Experimental Therapies for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension ». *Journal of Experimental Pharmacology* 13 (août): 817-57. https://doi.org/10.2147/JEP.S236743.

Zuo, Xiangrong, Feng Zong, Hui Wang, Qiang Wang, Weiping Xie, et Hong Wang. 2011. « Iptakalim, a novel ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation by downregulation of PKC-α ». *Journal of Biomedical Research* 25 (6): 392-401. https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60052-3.

Zyrianova, Tatiana, Benjamin Lopez, Andy Liao, Charles Gu, Leanne Wong, Michela Ottolia, Riccardo Olcese, et Andreas Schwingshackl. 2021. « BK Channels Regulate LPS-Induced CCL-2 Release from Human Pulmonary Endothelial Cells ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 64 (2): 224-34. https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0228OC.

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Comprendre le rôle des canaux potassiques KCNK3-TASK-1 et KATP dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire

Mots clés : Hypertension artérielle pulmonaire, KCNK3, KATP, canal potassique

Résumé : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie cardio-pulmonaire dévastatrice due à une obstruction progressive des artères pulmonaires distales (<500 µm de diamètre) entraînant l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et puis d'une insuffisance cardiaque droite.
À ce jour il a été décrit une vingtaine de gènes mutés chez des patients HTAP dont 2 sont des canaux potassiques : KCNK3 et ABCC8.
Il a été mis en évidence que les mutations dans le gène KCNK3 entrainaient une perte de fonction du canal. De plus notre équipe a démontré que cette perte de KCNK3 est un marqueur du développement de l'HTAP puisqu'on le retrouve dans plusieurs formes d'HTAP ainsi que dans les modèles animaux d'HTP. Durant ma thèse je me suis intéressée à mettre en évidence l'implication de la perte de fonction de KCNK3 en réalisant une analyse protéomique des CML-APs et CE-APs traitée avec un siKCNK3 comparée au siControle. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence plusieurs voies de signalisation et fonctions biologiques dérégulées par la perte de KCNK3.
D'autre part la découverte en 2018 dans des patients HTAP de mutations du gène ABCC8 codant pour la sous-unité SUR1 du canal potassique KATP SUR1/Kir6.2 nous a conduit à étudier ce canal dans la physiopathologie de l'HTAP. De par des expériences in-vitro, ex-vivo et in-vivo, nous avons mis en évidence l'intérêt thérapeutique de SUR1 dans l'HTAP. Pour finir, nous avons également voulu déterminer le rôle du KATP SUR2/Kir6.1 qui présente une grande homologie avec SUR1/Kir6.2. Notre étude sur ce canal a permis de démontrer que l'activation de ce canal dans le système vasculaire pulmonaire pouvait atténuer le développement de l'HTAP.

Title : To decipher the role of potassium channels KCNK3/TASK-1 and KATP in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension

Keywords : Pulmonary arterial hypertension, KCNK3, KATP, potassium channel

Abstract : Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating cause of PH due to a progressive narrowing of the distal pulmonary arteries (<500 µm in diameter) resulting in high pulmonary vascular resistance and right heart failure. To date, about twenty genes have been described as mutated in PAH patients, among them there are two potassium channels: KCNK3 and ABCC8. It has been shown that mutations in KCNK3 gene lead to a loss of function of the channel. Moreover, our team demonstrated that this loss of KCNK3 is a hallmark of PAH development since it was found in several PAH forms as well as in animal models of PH.
During my thesis, i was interested in highlighting the implication of the loss of function of KCNK3 by performing proteomic analysis in PASMCs and PAECs treated with a si KCNK3 compared to the si Control. This analysis allow us to highlight several signalling pathways and biological pathways deregulated by KCNK3 loss of function.
On the other hand, the discovery in 2018 in PAH patients of mutations on ABCC8 gene coding for the SUR1 subunit of the KATP SUR1/Kir6.2 potassium channel led us to study this channel in the pathophysiology of PAH. Through in-vitro, ex-vivo and in-vivo experiments, we have highlighted the therapeutic interest of SUR1 in PAH. Finally, we also wanted to determine the role of the KATP SUR2/Kir6.1 which share a great homology with SUR1/Kir6.2. Our study on this channel allowed us to demonstrate that the activation of this channel in the pulmonary vascular system could attenuate the development of PAH.